

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MILANO

Scuola di Dottorato in Scienze Morfologiche, Fisiologiche e dello Sport

Dipartimento di Scienze Biomediche per la Salute

Dottorato in Scienze dello Sport XXV° ciclo



LA NUTRIGENOMICA

**NEL DIFFERENZIAMENTO MUSCOLARE SCHELETRICO:
RUOLO DEL RESVERATROLO NEL PROCESSO DI MIOGENESI
ED IPERTROFIA IN MIOBLASTI MURINI**

**Tesi di Dottorato di
Anna MONTESANO
Matr. R08504**

Tutor : Prof. Livio Luzi

Coordinatore del Dottorato: Prof. Livio Luzi

Anno Accademico 2011/2012

INDICE

<u>ABSTRACT</u>	<u>5</u>
<u>1. INTRODUZIONE</u>	<u>8</u>
1. LA GENOMICA NUTRIZIONALE	9
1.1 LA NUTRIGENETICA	12
1.2 LA NUTRIGENOMICA	13
1.3 L'EPIGENETICA NUTRIZIONALE	15
2 IL MUSCOLO SCHELETRICO	17
2.1 INTRODUZIONE	17
2.2 ORGANIZZAZIONE GENERALE DELLA FIBRA MUSCOLARE STRIATA SCHELETRICA	17
2.3 MIOFIBRILLE	20
2.4 MIOFILAMENTI	21
2.5 PROTEINE CONTRATTILI	21
2.6 RETICOLO SARCOPLASMATICO	23
2.7 ASPETTI MORFOLOGICI DELLA CONTRAZIONE	24
2.8 TIPI DI FIBRE MUSCOLARI SCHELETRICHE	24
2.9 GIUNZIONI NEUROMUSCOLARI	25
2.9.1 PROPAGAZIONE DELL'IMPULSO NERVOSO	25
2.10 ISTOGENESI E RIGENERAZIONE DEL TESSUTO MUSCOLARE STRIATO SCHELETRICO	26
3 IL DIFFERENZIAMENTO MUSCOLARE	28
3.1 I MIOBLASTI COME SISTEMA MODELLO PER LO STUDIO DEI PROCESSI DI PROLIFERAZIONE E DIFFERENZIAMENTO MUSCOLARE	28
3.2 LE FASI DEL DIFFERENZIAMENTO MUSCOLARE	29

3.3 FATTORI CHE REGOLANO IL PROCESSO DI MIOGENESI	30
3.4 FATTORI TRASCRIZIONALI Pax	33
3.5 COORDINAZIONE DEI FATTORI DI REGOLAZIONE MIOGENICA	35
3.6 RELAZIONI MOLECOLARI E FUNZIONALI TRA CICLO CELLULARE E DIFFERENZIAMENTO MUSCOLARE	38
3.6.1 REGOLAZIONE DI CICLINE E CHINASI CICLINA-DIPENDENTI DURANTE LA MIOGENESI	38
3.7 RUOLO DI pRb NELL'ARRESTO DEL CICLO CELLULARE E NEL DIFFERENZIAMENTO MUSCOLARE	40
4 IPERTROFIA MUSCOLARE SCHELETRICA	42
4.1 MECCANISMI MOLECOLARI COINVOLTI NELLA GENESI DI IPERTROFIA MUSCOLARE	43
4.1.1 FATTORI DI CRESCITA	45
5. IL METABOLISMO ENERGETICO CELLULARE: AMPK	48
5.1 STRUTTURA DI AMPK	48
5.2 ATTIVAZIONE DI AMPK	48
5.3 RUOLO DI AMPK NELLA REGOLAZIONE DEL METABOLISMO AEROBICO, NELL'OSSIDAZIONE DEGLI ACIDI GRASSI E NELLA SINTESI DEL COLESTEROLO	50
5.4 RUOLO DI AMPK NEL CONTROLLO DELLA MASSA MUSCOLARE SCHELETRICA	51
6. IL PARADOSSO FRANCESE	52
6.1 IL RESVERATROLO	54
6.1.1 IL RESVERATROLO E LA LONGEVITA'	58
6.1.2 IL RESVERATROLO NEL SISTEMA CARDIOVASCOLARE	58
6.1.3 IL RESVERATROLO COME AGENTE ANTIOSSIDANTE	59
6.1.4 IL RESVERATROLO E L'INFIAMMAZIONE	60
6.1.5 IL RESVERATROLO NELL'OSTEOPOROSI E NEL DIABETE	60
6.1.6 IL RESVERATROLO NEL SISTEMA MUSCOLARE	61

2. SCOPO DELLA TESI	62
3. MATERIALI E METODI	65
MATERIALI	66
3.1 COLTURE CELLULARI	67
3.1.1 CONDIZIONI DI COLTURA	68
3.1.2 SUBCULTURA DI CELLULE C2C12	68
3.1.3 DIFFERENZIAMENTO MUSCOLARE SCHELETRICO	69
3.1.4 CONGELAMENTO E SCONGELAMENTO DELLE CELLULE	69
3.1.5 SCHEMA DEI TRATTAMENTI CON RESVERATROLO	70
3.2 VALUTAZIONE DELLA PROLIFERAZIONE CELLULARE	72
3.2.1 CONTEGGIO VITALE CON TRYPAN BLUE E CURVA DI CRESCITA	72
3.3 ANALISI DELL'ESPRESSIONE GENICA	73
3.3.1 REAL TIME PCR	73
3.3.2 RT-PCR ARRAY	74
3.4 IMMUNOFLUORESCENZA	76
3.5 WESTERN BLOT	78
3.5.1 SDS-PAGE	79
3.5.2 IMMUNOBLOTTING	80
3.6 ANALISI STATISTICA	81
4. RISULTATI	82
4.1 ESPERIMENTO DOSE/RISPOSTA	83
4.2 STUDIO DELLA FASE PROLIFERATIVA	85
4.3 INDUZIONE E PROGRESSIONE DEL DIFFERENZIAMENTO	93
4.4 STUDIO DEL PROCESSO IPERTROFICO	108
5. DISCUSSIONE	118
6. BIBLIOGRAFIA	126
RINGRAZIAMENTI	146

ABSTRACT

Nutrigenomics in musculoskeletal differentiation: Resveratrol action on myogenesis process and hypertrophy induction in C2C12 myoblasts

The new era of nutrition research translates empirical knowledge to evidence-based molecular science, because food components interact with our body at system, organ, cellular and molecular level. Modern nutrition research focuses on promoting health, preventing or delaying the onset of disease, optimizing performance and assessing risk.

Nutrigenomics studies elucidate the ability of bioactive food components to influence gene expression pattern, protein synthesis, degradation and post-translational modifications. Understanding the interrelationship among genome function, cellular metabolism processes and dietary components will enable precise realization of the “Personalized Nutrition” to optimize individual health, diagnosis and nutritional treatment of several chronic diseases, and perhaps increase human longevity.

Regulation of skeletal muscle formation (myogenesis) is essential for normal development as well as to prevent pathological conditions such as muscular dystrophies and inflammatory myopathies.

Skeletal muscle differentiation is a dynamic multistep process that involves two simultaneous phenomena. The first is the induction of muscle-specific genes expression by Myogenic Regulatory Factors (MRFs), such as Myf-5, MyoD, Myf-6 and Myogenin. Second phase is the commitment of myogenic cell into skeletal muscle: mononucleated undifferentiated myoblasts break free from the cell cycle, elongate and fuse into multinucleated myotubes.

Furthermore, cytoskeletal reorganization and severe activation of specific protein kinases represent key regulator mechanisms of skeletal muscle metabolism.

Skeletal muscle hypertrophy can be defined as an overall augmentation in muscle mass, as a result of an increase in the size of pre-existing skeletal muscle fibers accompanied by enhanced protein synthesis without an apparent increase in the number of myofibers. Many studies have established that Insulin Like Growth Factor 1 (IGF-1) strongly activates muscle hypertrophy by stimulating the PI3-K/AKT kinases pathway. AKT, in turn, activates the downstream kinase mTOR, which stimulates p70 S6 kinase and other effectors, ultimately culminating in enhancing protein synthesis.

Resveratrol (RSV), natural polyphenol found in grapes and in other fruits, has a plethora of health benefits in a variety of human diseases: cardio and neuroprotection, immune regulation, cancer chemoprevention, DNA repair, activation of Sirtuins (SIRT1), prevention of mitochondrial disorder, avoidance of obesity-related disease.

In skeletal muscle, RSV acts on protein catabolism and muscle function, conferring resistance against oxidative stress, injury and cell death, but its action mechanisms and protein targets are not completely known.

To elucidate the underlying mechanism of RSV action, much research has been focused on different tissues and cell types, but less attention has been given to its effect on myogenesis.

Aim of this work was the study of RSV effects on cell cycle regulation, differentiation process and hypertrophy genesis in C2C12 murine immortalized cell line, a good in vitro model for the major step of myoblasts proliferation and differentiation.

In detail, mouse myoblast C2C12 immortalized cell line is a subclone of C2 myoblasts, which spontaneously fuse and differentiate into multinucleated myotubes as a result of both the achievement of myoblast confluence and the removal of the serum growth factors.

After preliminary dose/response experiments, performed in order to determine the effective RSV dose able to induce biological response in C2C12 cells, two different concentrations of this natural compound was chosen: 0,1 and 25 μ M.

Cells were incubated in growth medium with/without RSV (0.1 or 25 μ M) for 24, 48, 72 hours to study proliferative phase.

To examine differentiation phases and hypertrophy induction, at 70% of confluence, cells were maintained in growth medium or transferred in differentiation medium both with/without RSV (0.1 or 25 μ M) for 24, 48, 72, 96 hours.

Results showed that RSV could regulate C2C12 myoblasts growth capacity. This effect were visible not only in the kinetics of cell growth, but also in the morphological changes. Data obtained from gene and protein expression studies showed how RSV can be able to act on cell cycle regulation to induce differentiation.

Also RSV could control MRFs expression and muscle-specific proteins synthesis during myogenesis progression.

In late differentiation, we evaluated the positive action of RSV on hypertrophy: RSV increased AMPK and IGF-1 proteins content and induced hypertrophic morphological changes in neo-formed myotubes, modulating cytoskeletal proteins expression.

In summary, these data demonstrate that RSV could be able to control proliferation, start myogenesis process and induce hypertrophy. RSV seems to be able of regulating cell cycle progression, following cell cycle arrest and early induction of differentiation, through its action on the expression of specific cell cycle regulators, myogenic regulatory factors and muscle-specific structural proteins.

This work may constitute novel proof of principle to potential use as integrator/drug for this nutrient compound in the treatment of clinical conditions characterized by chronic functional and morphological muscle impairment.

***Key words:* Nutrigenomics, Resveratrol, Proliferation, Myogenic Regulatory Factors, Muscle Differentiation, Hypertrophy.**

1. INTRODUZIONE

1. LA GENOMICA NUTRIZIONALE

“Che il cibo sia la tua medicina, che la medicina sia il tuo cibo” affermava Ippocrate più di 2400 anni fa, sottolineando così l’elevata importanza dell’alimentazione; Feuerbach inoltre, nel 1850, sosteneva che *“l’uomo è ciò che mangia e per pensare meglio dobbiamo alimentarci meglio”*.

Ad oggi è ampiamente riconosciuto e descritto come il regime alimentare possa esercitare un’importante azione regolatrice interagendo con meccanismi molecolari e modulando le funzioni fisiologiche dell’organismo: con il completo sequenziamento del genoma umano, la nuova definizione di *“Genetica Nutrizionale”* ha sostituito l’originaria descrizione dell’interazione gene-nutriente [1], e il termine *“Nutraceutica”*, che trae la sua origine dall’unione delle voci nutrizione e farmaceutica, introduce il concetto del mantenimento di un buono stato di salute mediante il controllo del regime alimentare individuale [2].

Secondo la definizione classica dell’Organizzazione Mondiale della Sanità, la salute viene definita come uno stato di completo benessere fisico, mentale e sociale e non semplicemente l’assenza di malattia o infermità.

La Genomica Nutrizionale rappresenta un’area di recente interesse e studio che può essere suddivisa in due grandi sottoaree: la branca della Nutrigenetica descrive come il profilo genetico individuale possa avere un diverso impatto sull’assunzione, l’assorbimento ed il metabolismo dei nutrienti assunti con la dieta, mentre la Nutrigenomica studia le interazioni tra i fattori nutritivi degli alimenti assunti e la regolazione dell’espressione genica, descrivendo i possibili cambiamenti nel metabolismo cellulare e nella regolazione della sintesi proteica dovuti ad un determinato regime alimentare, *Figura 1.1* [3,4].

Acquisisce quindi un’estrema rilevanza lo studio accurato delle interazioni “gene-alimento” nella progettazione di diete e regimi alimentari personalizzati e specifici per definite caratteristiche genetiche individuali, con lo scopo di ottimizzare l’efficienza di risposta ai fattori nutritivi nel mantenimento di uno stato di salute e benessere fisico.

I nutrienti rappresentano fattori ambientali in grado di interagire con il genoma. E’ ormai ampiamente delucidato che il metabolismo e la riparazione dei danni a carico del DNA sono strettamente correlati con una numerosa varietà di fattori dietetici in grado di agire come cofattori o substrati nelle vie metaboliche cellulari, ma ancora poco si conosce riguardo al reale impatto della carenza o dell’eccesso di tali cofattori e/o micronutrienti sulla replicazione del DNA e sul mantenimento della stabilità genomica [5].

Anche se i nutrienti assunti con la dieta possono essere in grado di modificare le caratteristiche di un particolare fenotipo, è necessario considerare lo specifico genotipo individuale nella risposta a determinati nutrienti [6].

Nell'ambito delle scienze della nutrizione, sempre maggiore importanza ha assunto il concetto dell'effetto dei nutrienti sulla stabilità del genoma, sulle capacità di riparazione del DNA e sull'espressione genica. Numerosi componenti della dieta possono alterare l'espressione genica e gli eventi epigenetici e, conseguentemente, influenzare lo stato di salute di un individuo [7,8,9,10].

Nutrienti e genoma interagiscono su due livelli: i nutrienti possono indurre o reprimere l'espressione genica modificando quindi il fenotipo individuale; viceversa, i polimorfismi a singolo nucleotide possono modificare l'attività biologica di importanti vie metaboliche cellulari, alterando l'interazione dei componenti nutritivi con queste vie [4,6,7,11].

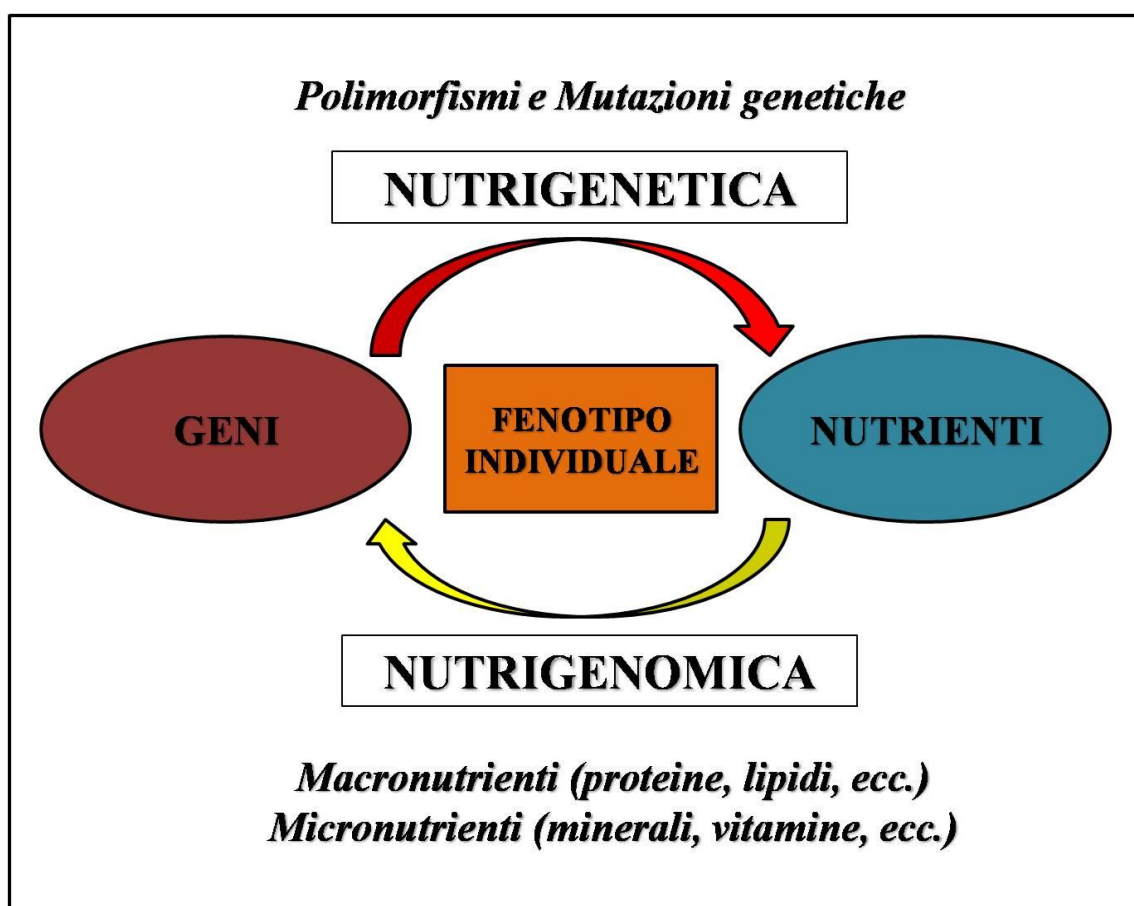


Figura 1.1 : *La Nutrigenetica e la Nutrigenomica nello studio delle interazioni gene-nutriente.*

Le interazioni tra i nutrienti e i processi genetici cellulari vengono descritte con l'espressione "Genomica Nutrizionale". Questo termine racchiude l'aspetto biochimico ma anche l'apporto del patrimonio genetico nella comprensione di reazioni cellulari a livello molecolare e interazioni metaboliche nella nutrizione umana [12,13].

I principi di base di questa ricerca genomica possono essere sintetizzati in cinque principi:

- 1) Alcuni geni, o varianti genetiche di alcuni geni coinvolti nella regolazione della risposta a nutrienti possono svolgere un ruolo chiave nell'insorgenza, nell'incidenza e nella progressione di condizioni patologiche croniche.
- 2) Il grado con cui la dieta può influenzare il corretto bilancio tra lo stato di salute e quello di malattia può dipendere dal corredo genetico dell'individuo.
- 3) I componenti chimici dei nutrienti assunti con la dieta possono agire sul genoma umano, direttamente o indirettamente, e alterare così l'espressione genica.
- 4) In alcune circostanze e per alcuni individui, il regime alimentare può rappresentare un fattore di rischio importante per l'insorgenza di un notevole numero di patologie.
- 5) Interventi sul regime alimentare basati sulla conoscenza del fabbisogno nutrizionale individuale, dello stato di salute e del patrimonio genetico (la cosiddetta "nutrizione personalizzata") possono essere impiegati allo scopo di prevenire, alleviare e curare patologie croniche [12,13,14].

1.1 LA NUTRIGENETICA

Il termine Nutrigenetica è stato usato per la prima volta dal Dr R.O. Brennan nel 1975 nel suo elaborato intitolato “Nutrigenetics: new concepts for relieving hypoglycemia”, proponendo in questo lavoro la possibilità di studiare in che modo il corredo genetico di un individuo può avere un determinato effetto sul regime alimentare [15,16].

Anche se lo studio dell'interazione gene-nutriente fa parte di un'area scientifica in continua evoluzione, l'ipotesi, ormai più che avvalorata in letteratura, che una dannosa relazione tra regime alimentare e patrimonio genetico individuale potrebbe causare uno stato di malattia non è di recente acquisizione. Inoltre è ormai noto che un'inappropriata dieta alimentare abbinata a determinate caratteristiche genetiche potrebbe rappresentare un fattore di rischio importante nell'insorgenza di patologie di natura genetica [12,17].

La nutrigenetica indaga in particolare gli effetti delle mutazioni nei geni associati alla nutrizione, responsabili dell'assorbimento dei micronutrienti e del metabolismo, come anche gli effetti dietetici sulla salute.

I polimorfismi genetici possono influenzare la risposta a fattori ambientali, come ad esempio le modificazioni nell'attività enzimatica e l'efficacia di componenti chimici dei nutrienti e loro metaboliti [7, 18].

Tra i diversi polimorfismi genetici, i polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) rappresentano la più comune tipologia di variazione genetica e sono presenti almeno nell'1% della popolazione [7]. In letteratura sono riportati diversi studi in cui è dimostrata l'evidente interazione tra la presenza di polimorfismi in specifici geni e la risposta metabolica a seguito dell'assunzione di determinati nutrienti. L'analisi di questi polimorfismi rappresenta quindi un fondamentale strumento di indagine molecolare per lo studio del ruolo della nutrizione nel mantenimento dello stato di salute, nell'insorgere di patologie e nell'identificazione di un regime alimentare ottimale [11,15,17].

1.2 LA NUTRIGENOMICA

La nutrigenomica ha come scopo l'identificazione degli effetti dei principali nutrienti, inclusi macronutrienti e micronutrienti, sul genoma, e l'esplorazione delle interazioni che intercorrono tra la componente genica e i nutrienti alimentari nel determinare lo stato di salute [16,19].

L'insieme degli effetti della dieta sull'attività trascrizionale, sull'espressione genica e sulla natura eterogenea delle risposte di varianti geniche costituisce la nutrigenomica [19].

Il campo della nutrigenomica utilizza molteplici discipline e valuta gli effetti della dieta sulla stabilità del genoma (danni al DNA a livello molecolare e cromosomico), le eventuali alterazioni all'epigenoma (metilazione del DNA), le modificazioni nell'espressione di RNA e mRNA (trascrittomica), l'espressione proteica (proteomica) e lo studio dei metaboliti (metabolomica), ognuna delle quali può essere studiata indipendentemente o in modo integrato per diagnosticare lo stato di salute o di malattia [10,19].

Questa branca della Genomica Nutrizionale si avvale dell'uso di strumenti di genomica funzionale al fine di studiare i sistemi biologici e comprendere in quali modi i nutrienti assunti con la dieta possono interagire con le vie metaboliche cellulari e controllare così lo stato di omeostasi [6,10,16].

La ricerca in campo nutrigenomico e nutrigenetico consente di sviluppare regimi alimentari personalizzati in un determinato range di nutrienti e sulla base della conoscenza specifica del patrimonio genetico individuale, mediante l'impiego di tecniche di indagine a livello di trascrizione genica, sintesi proteica e metabolismo cellulare. Infatti, come ampiamente descritto in letteratura, i nutrienti assunti con la dieta sono in grado di alterare l'espressione genica agendo su più livelli di regolazione: controllo della trascrizione, trasduzione del segnale, struttura cromatinica e funzionalità proteica [5,18,19,20,21,22,23].

Studi epidemiologici hanno evidenziato la stretta associazione tra l'assunzione di determinati nutrienti e l'insorgenza ed il grado di severità di patologie croniche. Un considerevole numero di patologie legate allo stato nutrizionale quali obesità, sindrome metabolica, diabete di tipo 2, patologie a carico dell'apparato cardiovascolare e alcuni tipi di neoplasie, hanno una base poligenica e multifattoriale e la loro evoluzione e progressione è correlata a varianti geniche multiple ma anche a fattori ambientali quali appunto il regime alimentare [24,25,26,27,28].

I componenti biochimici presenti nei nutrienti possono agire sul controllo dell'espressione genica in maniera diretta o indiretta. A livello cellulare, i nutrienti possono fungere da ligandi per i recettori di fattori di trascrizione, oppure essere metabolizzati mediante pathways metabolici, alterando quindi la concentrazione di substrati o intermedi metabolici e regolando infine l'intera via di signaling cellulare [23,29,30,31].

Ci sono tre fattori principali che fanno della nutrigenomica e della nutrigenetica delle discipline, sebbene giovani, molto importanti. In primo luogo vi è nella popolazione una grande diversità nel genoma ereditato, sia tra gruppi etnici sia tra singoli individui, tale da influenzare la biodisponibilità dei nutrienti ed il loro metabolismo. In secondo luogo, ogni individuo ha una disponibilità di cibo/nutrienti in relazione allo stato culturale, alla situazione economica, alla posizione geografica e al gusto ed infine la malnutrizione (per eccesso o per difetto) può influenzare l'espressione genica e la stabilità del genoma portando a mutazioni della sequenza del DNA che possono determinare un'anomala espressione genica, manifestando fenotipi diversi durante le varie fasi di vita.

Gli studi epidemiologici sono stati molto importanti per identificare le associazioni tra fattori di rischio e insorgenza della malattia nei vari gruppi di popolazioni.

Possiamo considerare la nutrigenomica come una scienza multidisciplinare che viene dopo la caratterizzazione del genoma umano e che pone una maggiore attenzione ai dati riguardanti il genoma rispetto a quelli biochimici ed epidemiologici, con l'obiettivo di comprendere gli aspetti eziologici di malattie croniche come il cancro, il diabete mellito di tipo 2, l'obesità, le malattie cardiovascolari, la sindrome metabolica, ecc. [32].

1.3 L'EPIGENETICA NUTRIZIONALE

Il termine “Epigenetica” si riferisce a modificazione dei livelli di espressione genica che si verificano senza cambiamenti nella sequenza del DNA.

La regolazione epigenetica gioca un ruolo fondamentale nella fase dello sviluppo e risulta essere necessaria nel controllo della stabilità di espressione o repressione di geni specifici in tipi cellulari diversi, a stadi determinati del processo di sviluppo [8,33].

I cambiamenti epigenetici possono influenzare la regolazione del ciclo cellulare, i danni a carico del DNA, i processi di apoptosi, imprinting e invecchiamento cellulare [8,10].

I componenti nutritivi assunti con la dieta possono modificare attivamente questa serie di eventi epigenetici agendo su livelli diversi di regolazione. La maggioranza delle proteine regolatrici include le DNA metiltrasferasi, le proteine di legame dinucleotidiche metil-citosin guanine, gli enzimi coinvolti nelle modificazioni istoniche, i fattori di rimodellamento della cromatina e ulteriori complessi molecolari legati all'attività funzionale di queste proteine aventi attività regolatrice [10,33].

La modificazione epigenetica più studiata è sicuramente la metilazione del DNA e numerosi lavori descrivono ampiamente l'azione di nutrienti e composti biochimici sul controllo della distribuzione dei gruppi metilici e sull'attività enzimatica delle metiltrasferasi. Tra i più studiati fattori nutritivi è importante citare: alcool, arsenico, betaina, cadmio, colina, fibre, folati, genisteina, metionina, nichel, polifenoli, selenio, vitamine A, B6, B12, zinco [10, 33, 34,35].

Appare quindi chiaro che anche piccoli danni a carico del genoma possono causare effetti importanti nell'arco della vita di un individuo [35,36].

Il mantenimento di un corretto regime alimentare, lo stato di nutrizione e lo studio del genoma (la cosiddetta “Nutrizione personalizzata”) possono essere di fondamentale importanza nella prevenzione, nel controllo e nel trattamento di patologie croniche come quelle a carico dell'apparato cardiovascolare, la sindrome metabolica e le neoplasie [37]. Questi disordini solo correlati all'assunzione cronica di specifici componenti nutritivi, è infatti ben nota la correlazione tra l'introito calorico complessivo, i livelli e i tipi di vitamine, grassi e carboidrati assorbiti con la dieta e l'insorgenza di aterosclerosi, diabete, obesità, tumori, ipertensione e ulteriori patologie croniche [38,39,40].

Come descritto in precedenza, lo stato nutrizionale è in grado di influenzare la stabilità del genoma, e la carenza o l'assenza di micronutrienti può causare alterazioni dannose a carico del DNA.

La risposta alle componenti biochimiche presenti nel cibo è determinata dal background genetico (effetto nutrigenetico) dell'individuo, che può regolare le modalità di assorbimento e i processi metabolici.

Inoltre, la risposta a determinati componenti nutritivi contenuti negli alimenti assunti con la dieta risulta essere strettamente dipendente dallo stato di metilazione del DNA e da altri eventi di regolazione epigenetica. L'azione modulatrice esercitata da alcuni nutrienti sui pattern di espressione genica (effetto nutrigenomico), costituisce un fattore determinante nella risposta finale.

I componenti bioattivi presenti nei nutrienti possono influenzare inoltre la sintesi proteica, la degradazione, le modificazioni post-trascrizionali.

La comprensione delle relazioni che intercorrono tra la diversità genetica di un individuo, la funzionalità genomica ed il regime alimentare consentirà una specifica manipolazione del genoma e un controllo preciso della stabilità genetica, al fine di perseguire il raggiungimento di un ottimo stato di salute, la prevenzione di insorgenza di patologie croniche multifattoriali e, di conseguenza, l'aumento della longevità [41,42,43].

La capacità della dieta di influenzare l'espressione genica può manifestarsi agendo su più siti di regolazione. I progressi nelle scienze *-omiche*, hanno permesso una comprensione più rapida e completa di come i composti bioattivi influenzano la salute umana, soprattutto quando sono considerati insieme ai dati anamnestici relativi a fattori nutrizionali, clinici, fisiologici, demografici, ambientali e di stile di vita. Gli effetti biologici delle sostanze nutritive e dei composti bioattivi degli alimenti dipendono da una serie di processi fisiologici tra cui l'assorbimento, il trasporto, la biotrasformazione, l'utilizzazione, la conservazione e l'escrezione, e dai meccanismi di azione cellulare come il legame con i recettori nucleari che disciplinano i fattori di trascrizione. Ognuno di questi processi può coinvolgere diversi geni, ciascuno dei quali può avere una serie di polimorfismi comuni la cui espressione potrebbe alterare la specifica funzione e la risposta fisiologica ad un composto presente nella dieta. La ricerca delle interazioni nutrienti-genoma ha portato anche alla scoperta di come i geni influenzano le preferenze alimentari agendo sui percorsi sensoriali o sul metabolismo energetico [41,42,43].

2. IL MUSCOLO SCHELETRICO

2.1 INTRODUZIONE

Il tessuto muscolare scheletrico costituisce i muscoli scheletrici di tutto l'organismo, responsabili dei movimenti dei diversi segmenti ossei.

In un muscolo scheletrico l'unità morfologica è la fibra muscolare striata [44]. Essa è caratterizzata, lungo l'asse maggiore, dall'alternanza di bande chiare e bande scure il cui significato è da mettere in relazione alla presenza citoplasmatica di elementi fibrillari longitudinali di piccole dimensioni, le miofibrille. La disposizione reciprocamente parallela di questi elementi all'interno della fibra determina la comparsa di una striatura longitudinale.

Le fibre muscolari scheletriche sono sincizi polinucleati derivati, durante lo sviluppo, dalla fusione di elementi mononucleati, i mioblasti.

Le fibre hanno forma di cilindri o di poliedri ad angoli arrotondati, con una lunghezza variabile da 1 mm ad un massimo di 12 cm nel muscolo sartorio, e un diametro che può variare da un minimo di 10 μm ad un massimo di 100-105 μm . Generalmente le fibre sono, però, sempre più corte del muscolo del quale fanno parte [44].

2.2 ORGANIZZAZIONE GENERALE DELLA FIBRA MUSCOLARE STRIATA SCHELETRICA

In un muscolo le fibre muscolari sono disposte parallelamente le une alle altre e sono tenute insieme da un'impalcatura di connettivo. Il muscolo è avvolto esternamente da una guaina connettivale molto consistente che prende il nome di epimisio; dalla faccia interna di questa guaina si dipartono sepimenti che vanno a circondare più fasci di fibre muscolari, prendendo il nome di perimisio; sottili setti più delicati si estendono dal perimisio a circondare le singole fibre muscolari costituendo l'endomisio, formato da una trama di fibre reticolari, capillari sanguigni e qualche cellula connettivale. L'endomisio costituisce la membrana basale di ciascuna fibra muscolare [45].

Ogni singola fibra muscolare è delimitata da una comune membrana plasmatica, detta sarcolemma, che circonda e racchiude la massa di citoplasma, chiamata sarcoplasma, nella quale sono immerse le miofibrille e gli organuli citoplasmatici.

Il sarcolemma è rivestito, al suo esterno, da una lamina basale (costituita da glicosaminoglicani, proteoglicani, glicoproteine e da collagene di tipo IV) e da una fitta rete di fibre reticolari.

Il sarcolemma è molto sottile, elastico e assai resistente, per cui segue i cambiamenti di forma della fibra restandovi aderente anche nel corso di una forte contrazione.

Dal lato citoplasmatico il sarcolemma è protetto da una proteina chiamata distrofina che, connettendo la rete sottomembranosa di microfilamenti alla superficie citoplasmatica del sarcolemma, concorre al rafforzamento di quest'ultimo nei confronti delle forze che si generano durante la contrazione.

Poiché la fibra muscolare è un sincizio polinucleato, essa possiede numerosi nuclei, che possono raggiungere anche il numero di diverse centinaia, situati immediatamente al di sotto della membrana plasmatica. Uno strato sottilissimo di sarcoplasma separa il nucleo dal sarcolemma. Non mancano, tuttavia, muscoli che presentano nuclei distribuiti in tutto il sarcoplasma [46].

Ciascun nucleo possiede un voluminoso nucleolo e ammassi di cromatina adesi alla superficie interna dell'involucro nucleare, che rappresentano, probabilmente, cromatina metabolicamente inattiva.

I nuclei non sono in grado di replicare, in quanto si trovano in un permanente stato postmitotico.

Nei muscoli scheletrici dei vertebrati è stata dimostrata la presenza di nuclei disposti alla periferia della fibra, esterni al sarcolemma e appartenenti a cellule di diversa natura, le cellule satelliti, addossate alla superficie della fibra muscolare. Queste cellule presentano un nucleo allungato e sono avvolte dalla stessa membrana basale che si trova attorno alla fibra muscolare. Le cellule satelliti sono state interpretate quali mioblasti quiescenti (cellule staminali), in grado di conferire al tessuto una discreta capacità rigenerativa [46].

La maggior parte del sarcoplasma è occupata dalle miofibrille, lunghe strutture cilindriche, altamente specializzate per la contrazione, il cui assetto ordinato conferisce alla fibra muscolare striata la caratteristica striatura trasversale, dovuta alla regolare alternanza di bande chiare e bande scure. L'impacchettamento longitudinale delle miofibrille genera, nella fibra muscolare striata, anche una striatura longitudinale.

La restante porzione del sarcoplasma contiene centrioli (in prossimità di ogni nucleo), gruppi di mitocondri (un tempo chiamati sarcosomi), più o meno numerosi e di dimensioni varie, gocce lipidiche, granuli di glicogeno dispersi tra le miofibrille e una cromoproteina, la mioglobina, funzionalmente simile all'emoglobina.

Nel sarcoplasma extrafibrillare si osserva, inoltre, un esteso reticolo endoplasmatico liscio, detto reticolo sarcoplasmatico, che circonda le miofibrille, *Figura 1.2* [45,46].

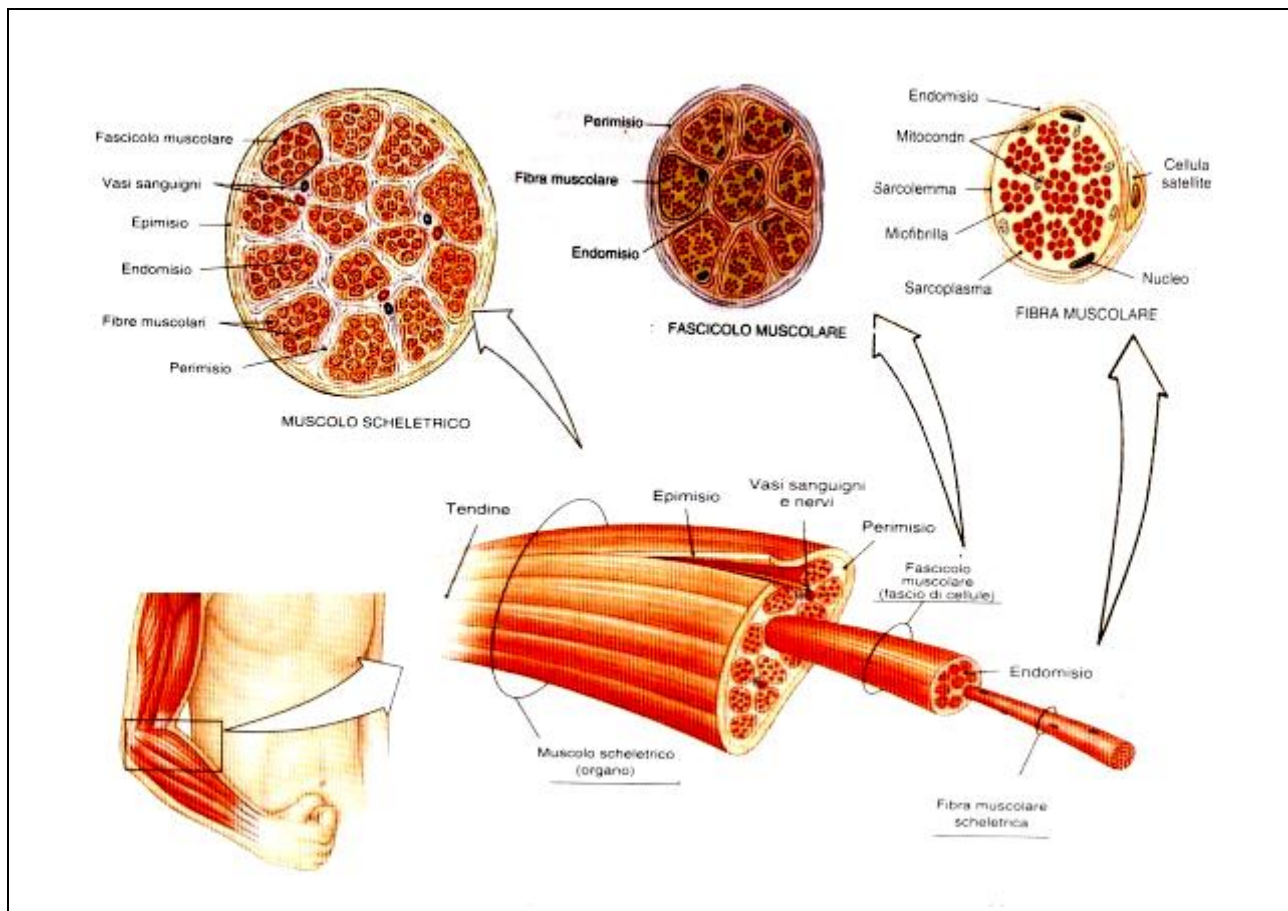


Figura 1.2 : *Organizzazione generale della fibra muscolare striata scheletrica.*

2.3 MIOFIBRILLE

Le miofibrille rappresentano la sede del fenomeno contrattile (*Figura 1.3*).

Nel sarcoplasma esse sono orientate secondo l'asse maggiore della fibra, hanno un diametro compreso tra 1 e 3 μm , sono disposte longitudinalmente nella fibra, sono birifrangenti e molto numerose, superando nel muscolo umano i cento milioni per centimetro quadrato.

Esaminate al microscopio a contrasto di fase, le miofibrille presentano una successione di bande scure e chiare, che si alternano con regolarità. Nei preparati allestiti per microscopia ottica, fissati e colorati, le prime sono più colorabili delle seconde; in luce polarizzata risultano birifrangenti o anisotrope, da cui il nome di bande A. Con reazioni citochimiche è stata messa in evidenza, a questo livello, la presenza di un'intensa attività ATPasica. I tratti di miofibrilla che si alternano con le bande A appaiono incolori nei preparati fissati e colorati ma, se osservati al microscopio a luce polarizzata, si mostrano isotropi e quindi chiari: per questo fatto prendono il nome di bande I. Ciascuna banda I risulta divisa in due parti uguali da una stria sottile, detta stria o linea Z [47,48].

La banda A appare occupata, nella parte centrale, da una sottile banda trasversale più chiara e a contorni poco precisi, che prende il nome di banda H; essa è attraversata, a sua volta, da una linea trasversale netta, anche se molto sottile, la stria o linea M.

Il tratto di miofibrilla compreso tra due linee Z contigue prende il nome di sarcomero e rappresenta l'unità funzionale dell'intero tessuto muscolare, mentre l'unità morfologica è rappresentata dalla cellula muscolare. Ciascuna miofibrilla quindi corrisponde ad una successione di piccoli cilindri, i sarcomeri, delimitati da due strie Z e costituiti da una mezza banda I, una banda A e un'altra mezza banda I.

Nella fibra muscolare, le miofibrille, addossate fra loro, mostrano le bande allineate esattamente allo stesso livello; sono cioè disposte a registro, per cui la fibra stessa risulta striata trasversalmente, se osservata al microscopio ottico in sezione longitudinale.

Le miofibrille risultano a loro volta costituite da unità più piccole, i miofilamenti [47,48].

2.4 MIOFILAMENTI

I miofilamenti sono disposti longitudinalmente, paralleli gli uni agli altri, e sono di due tipi diversi, per dimensioni e composizione chimica: i miofilamenti spessi, costituiti prevalentemente da miosina, e i miofilamenti sottili, costituiti da actina oltre che da tropomiosina e troponina (*Figura 1.3*).

I miofilamenti spessi hanno un diametro di 10-12 nm e una lunghezza di 1,5 μm ; una serie di filamenti, posti l'uno accanto all'altro ad una distanza di 45 nm, costituisce la banda A, occupandola per tutta la lunghezza. Questi filamenti presentano, a intervalli regolari, piccoli prolungamenti laterali, detti ponti, della lunghezza di circa 13 nm e disposti con regolarità in maniera da formare tra loro angoli differenti. Questi ponti permettono il contatto tra miofilamenti spessi e sottili durante la contrazione muscolare. I filamenti spessi, inoltre, presentano un diametro maggiore nella parte centrale e sono collegati tra loro da sottili espansioni oblique allineate al centro della banda H, dove formano la stria M.

I miofilamenti sottili hanno un diametro di 5-7 nm e una lunghezza di 1 μm , sono situati nella banda I e penetrano nella banda A arrivando fino ai limiti della banda H; pertanto la banda A risulta costituita, nelle sue zone periferiche, da entrambi i tipi di filamenti, mentre a livello della banda H vi sono soltanto quelli spessi; la banda I presenta unicamente filamenti sottili [46,47,48,49,50].

2.5 PROTEINE CONTRATTILI

Il fenomeno contrattile deve considerarsi una manifestazione cellulare presente in tutte le cellule eucariotiche. Indipendentemente dal luogo di svolgimento, la contrazione deve la sua genesi all'interazione ATP-dipendente di due proteine: l'actina e la miosina (*Figura 1.3*).

L'elevata efficienza termodinamica mostrata dalla contrazione della cellula muscolare striata scheletrica è rapportabile all'inusuale, elevato rapporto molare fra actina e miosina e all'ordinata disposizione spaziale dell'apparato contrattile, propri di questo stipite cellulare. Le isoforme relative alle proteine sopra menzionate ed il meccanismo di controllo del fenomeno contrattile variano in funzione del tipo di cellula considerato, ma le modalità con cui actina e miosina generano le forze meccaniche alla base della contrattilità rimangono sempre fondamentalmente inalterate [46,47,48].

Le succitate proteine o, per meglio dire, le strutture miofibrillari (miofilamenti spessi e sottili) ad esse rapportabili richiedono, per la corretta costruzione della miofibrilla, l'intervento di un complicato sistema di supporto [48,49,50].

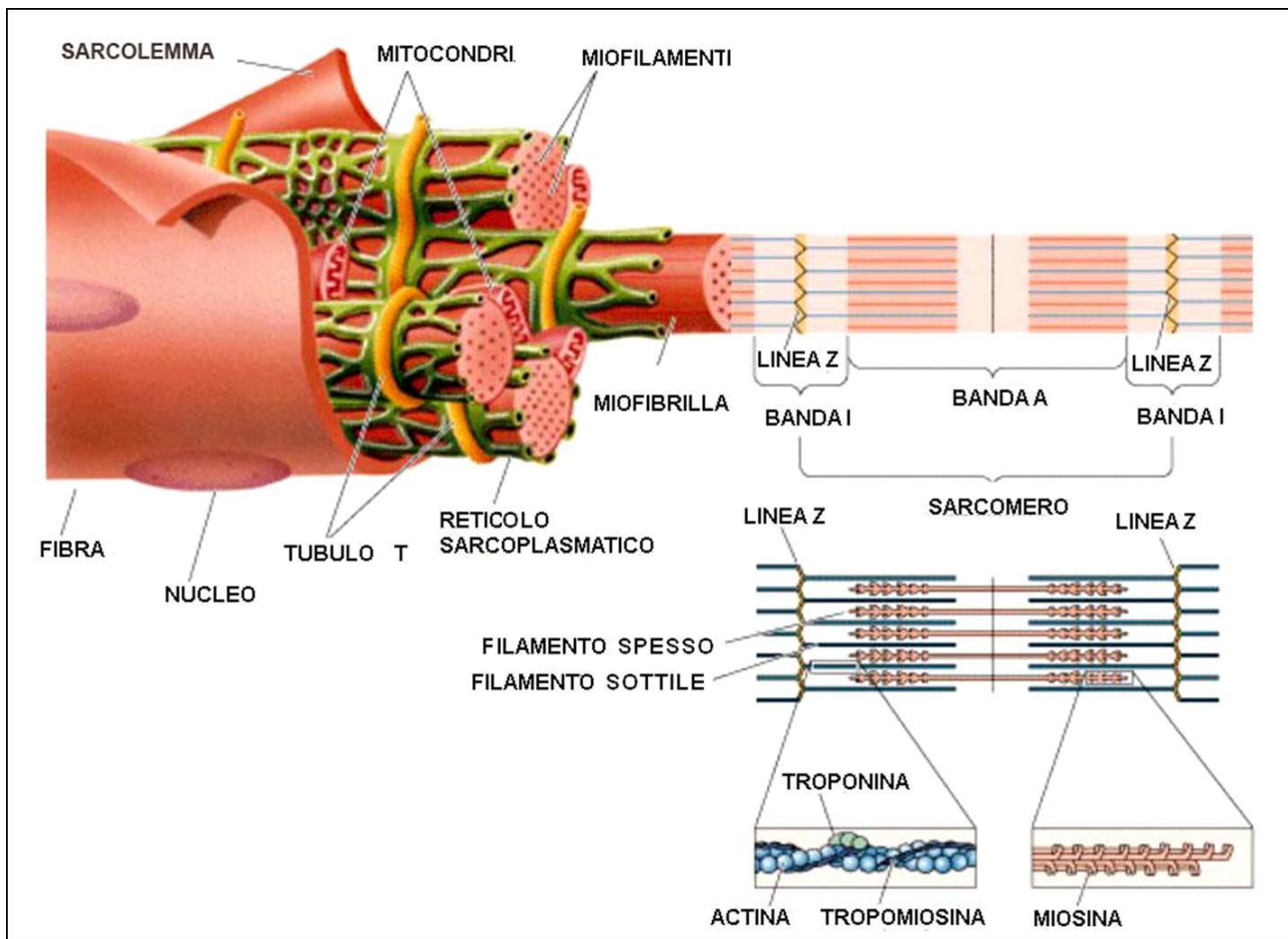


Figura 1.3 : *Struttura ed organizzazione delle miofibrille, dei miofilamenti e delle proteine contrattili nella fibra muscolare striata scheletrica.*

2.6 RETICOLO SARCOPLASMATICO

Il reticolo endoplasmatico liscio della fibra scheletrica prende il nome di reticolo sarcoplasmatico, si presenta molto sviluppato e con caratteristiche del tutto peculiari.

Al microscopio elettronico il reticolo sarcoplasmatico risulta formato da una serie di strutture tubulari che circondano le miofibrille, ripetendosi con regolarità lungo tutto il decorso miofibrillare. Queste strutture hanno una relazione costante e precisa con i sarcomeri.

In particolare, il reticolo sarcoplasmatico appare costituito da una serie di tubuli o canalicoli a fondo cieco, disposti longitudinalmente rispetto all'asse della fibra e provvisti di anastomosi laterali, che formano una rete intorno a ciascuna miofibrilla. Le anastomosi sono più marcate e disposte in tutte le direzioni all'altezza della banda H, dove costituiscono la cosiddetta cisterna fenestrata.

A intervalli regolari i tubuli longitudinali confluiscono saldandosi in canali di maggiore calibro orientati trasversalmente e costituenti ciascuno una cisterna terminale. Nei mammiferi le cisterne terminali sono localizzate in corrispondenza della zona di contatto tra la banda A e quella I.

Nella parte mediana della loro faccia esterna le cisterne terminali si associano con un altro elemento tubulare allungato e disposto trasversalmente, il tubulo trasverso o T; questo non appartiene al reticolo sarcoplasmatico ed è separato dalle cisterne terminali da uno spazio di circa 16 nm. Il tubulo trasverso comunica con lo spazio extracellulare e può essere considerato un'invaginazione del sarcolemma all'interno della finestra. La struttura costituita dal tubulo T associato alle due cisterne terminali prende il nome di triade sarcoplasmatica.

La funzione del reticolo sarcoplasmatico è svolta soprattutto dalla triade, chiamata anche reticolo giunzionale. A muscolo decontratto, nelle cavità delle cisterne terminali vengono immagazzinati gli ioni calcio. Nel contesto delle membrane che delimitano queste cavità si trova un'ATPasi calcio-dipendente (pompa del calcio) in grado di pompare ioni calcio dal sarcolemma nelle cavità delle cisterne terminali, contro un gradiente di concentrazione. Il lume delle cisterne contiene una proteina capace di sequestrare ioni calcio, chiamata calsequestrina.

Le membrane del tubulo T trasportano invece l'impulso nervoso, che viaggia lungo la membrana sarcolemmale, all'interno della fibra muscolare, dove induce il rilascio degli ioni calcio dalle cavità delle cisterne terminali: la liberazione degli ioni calcio rappresenta l'evento iniziale della contrazione muscolare [45,46,49,51,52].

2.7 ASPETTI MORFOLOGICI DELLA CONTRAZIONE

Ciascun sarcomero, unità funzionale del muscolo striato, è il risultato della sovrapposizione e compenetrazione di miofilamenti sottili (prevalentemente actinici) e spessi (prevalentemente miosinici). In ogni unità sarcomerica, due set di filamenti sottili (a orientamento opposto), partendo dal loro luogo di inserzione (a livello della rispettiva stria Z) si dirigono verso il centro del sarcomero stesso (che in condizioni di muscolo a riposo non raggiungono), inframezzandosi ai filamenti spessi costituenti la banda A. Quest'ultima, nella propria zona centrale (banda H), risulterà più chiara per la presenza dei soli filamenti spessi. La banda H, a sua volta, è attraversata centralmente dalla linea M, ovvero da quell'insieme di ponti proteici tesi a rendere i filamenti spessi solidali fra loro.

Con la contrazione e il conseguente accorciamento del sarcomero, si può notare la riduzione (fino alla scomparsa) sia della banda H che della banda I, oltre all'avvicinamento reciproco delle strie Z, le quali vanno a collocarsi nei pressi dei confini della banda A, la sola a rimanere dimensionalmente immutata. Se la fibrocellula muscolare striata viene stirata, si ottiene un risultato diametralmente opposto: l'ampiezza sia delle bande I sia di quelle H aumenta, mentre le strie Z si allontanano [49,50,53,54].

2.8 TIPI DI FIBRE MUSCOLARI SCHELETRICHE

I muscoli scheletrici, pur contraendosi generalmente in modo rapido e potente in un tempo definito, non sono costituiti da fibre muscolari aventi tutte le stesse caratteristiche morfofunzionali. Infatti, dal punto di vista ultrastrutturale, sono stati individuati un tipo di fibra muscolare striata detta rossa, una denominata bianca e una di tipo intermedio [55,56,57].

La fibra muscolare striata rossa possiede un diametro inferiore rispetto a quella bianca e un colorito rosso-bruno, per la maggior ricchezza di mioglobina nel sarcoplasma. La caratteristica di questo tipo di fibra è di possedere molti mitocondri di grandi dimensioni, raggruppati intorno al nucleo o posti in colonna tra le miofibrille. Questo tipo di fibre muscolari si trova in maggior numero in quei muscoli che richiedono una grande resistenza alla fatica muscolare; la loro contrazione avviene più lentamente rispetto alle altre fibre. La loro funzione interviene soprattutto nel momento in cui i muscoli soggiacciono a un tipo di contrazione isometrico, in particolare nel mantenimento della postura.

La fibra muscolare striata bianca è caratterizzata da una contrazione più rapida ed è meno resistente alla fatica. E' la fibra che possiede il diametro maggiore rispetto a tutte le altre e un maggior numero di miofibrille. Il colorito pallido è in rapporto ad una minore concentrazione di mioglobina. In ogni muscolo vi è poi una varietà di fibre muscolari con caratteristiche morfologiche e funzionali intermedie tra le fibre rosse e le fibre bianche.

Le modalità di contrazione che possono esprimere i vari muscoli sono in rapporto al numero e al tipo di fibre muscolari che li compongono [55,56,57].

2.9 GIUNZIONI NEUROMUSCOLARI

Le fibre muscolari scheletriche si contraggono in risposta ad eccitazioni che originano nel sistema nervoso centrale e sono condotte lungo l'assone di un nervo motore. Un singolo motoneurone serve molte fibre muscolari e l'insieme del neurone, del suo assone e delle fibre da esso innervate costituisce un'unità funzionale nota come unità motoria [58,59].

Una fibra nervosa penetra nel connettivo del muscolo, dove si suddivide svariate volte, raggiungendo le singole fibre in punti specifici, in corrispondenza dei quali termina con strutture denominate giunzioni neuromuscolari o placche motrici.

Una giunzione neuromuscolare, in sintesi, è costituita da una membrana presinaptica, formata dal neurilemma, e da una membrana postsinaptica, costituita dal sarcolemma, separate da uno spazio occupato da materiale che deriva dalla membrana basale delle due fibre che si insinua nelle pieghe del sarcolemma [58,59].

2.9.1 PROPAGAZIONE DELL'IMPULSO NERVOSO

La stimolazione del nervo determina una depolarizzazione della membrana dell'assone. L'onda di depolarizzazione si propaga lungo tutto l'assone fino alla sua terminazione, a livello delle sinapsi.

Ciò provoca la liberazione, nella fessura sinaptica, del mediatore chimico acetilcolina. Questa si lega a recettori specifici di natura proteica della membrana postsinaptica costituita dal sarcolemma, determinando in quest'ultimo un aumento di permeabilità agli ioni. Ne consegue il propagarsi, in tutto il sarcolemma, dell'onda di depolarizzazione e quindi la contrazione simultanea di tutte le miofibrille. Successivamente l'azione dell'acetilcolina viene bloccata nella fessura sinaptica, infatti essa va incontro a rapida inattivazione ad opera dell'enzima specifico acetilcolinesterasi, con conseguente interruzione della trasmissione dell'impulso [51,60,61].

2.10 ISTOGENESI E RIGENERAZIONE DEL TESSUTO MUSCOLARE STRIATO SCHELETRICO

Durante lo sviluppo embrionale dei vertebrati, le cellule indifferenziate, destinate a costituire il tessuto muscolare scheletrico, sono ben evidenti nel mesoderma, organizzato in segmenti disposti ai lati della corda dorsale e denominati somiti. Questi comprendono diversi territori dai quali si origina la struttura dello scheletro assile (sclerotomo) e la muscolatura scheletrica (miotomo). Dai miotomi si forma gran parte dei muscoli del tronco e della nuca, mentre gli altri muscoli derivano dal mesenchima [47].

Le cellule muscolari più primitive sono rappresentate da elementi mononucleati, i mioblasti. Questi, allorchè hanno raggiunto le sedi di formazione dei vari muscoli, dopo una rapida proliferazione, si dispongono in fila e si fondono a formare i miotubi, elementi polinucleati già caratterizzati dalla striatura trasversale. La differenziazione di questi elementi prosegue con lo spostamento dei nuclei che, dapprima centrali, si portano alla periferia.

La maggior parte delle informazioni sul processo di differenziamento dei mioblasti o miogenesi deriva da studi su elementi in coltura. In cellule coltivate in vitro, i mioblasti iniziano a sintetizzare proteine specifiche per la fibra muscolare allorchè interrompono il ciclo di moltiplicazione.

Prima di fondersi, i mioblasti si allungano e subiscono modificazioni a livello metabolico. Infatti, aumenta il numero dei mitocondri, si formano enzimi necessari per l'utilizzazione di glucosio e glicogeno, si sviluppano il reticolo endoplasmatico rugoso e quello sarcoplasmatico. La sintesi di tutti i componenti (proteine, enzimi, recettori) si completa però solo dopo la fusione [62,63].

L'accrescimento postnatale del tessuto muscolare striato scheletrico è dovuto essenzialmente ad un aumento di volume delle fibre, non ad una moltiplicazione. Anche l'ipertrofia del muscolo, in seguito ad attività prolungata, è il risultato dell'accrescimento volumetrico delle singole fibrocellule.

Il tessuto muscolare striato è dotato di capacità rigenerativa, seppur molto limitata. In caso di perdita di tessuto muscolare scheletrico la rigenerazione avviene ad opera delle fibre preesistenti con la comparsa di nuovi mioblasti che si dividono, mentre i nuclei della fibra scheletrica non vanno incontro a mitosi. Si è molto discusso sull'origine di queste cellule. Secondo le teorie più recenti la rigenerazione del tessuto muscolare dipenderebbe dalle cellule satelliti, considerate appunto quali mioblasti quiescenti. In caso di lesione del muscolo, queste cellule riacquisterebbero le loro caratteristiche embrionali, dando origine a strutture tubulari sinciziali del tutto simili ai miotubi, *Figura 1.4*.

E' tuttavia doveroso sottolineare che una lesione muscolare è quasi sempre accompagnata da danni all'endomisio. Quest'ultimo, di natura connettivale, possiede una capacità rigenerante estremamente più elevata di quella propria del muscolo. Il danno muscolare è spesso riparato per mezzo di un tessuto cicatriziale che, ovviamente, non presenta le caratteristiche meccaniche del tessuto muscolare che è andato a sostituire [64].

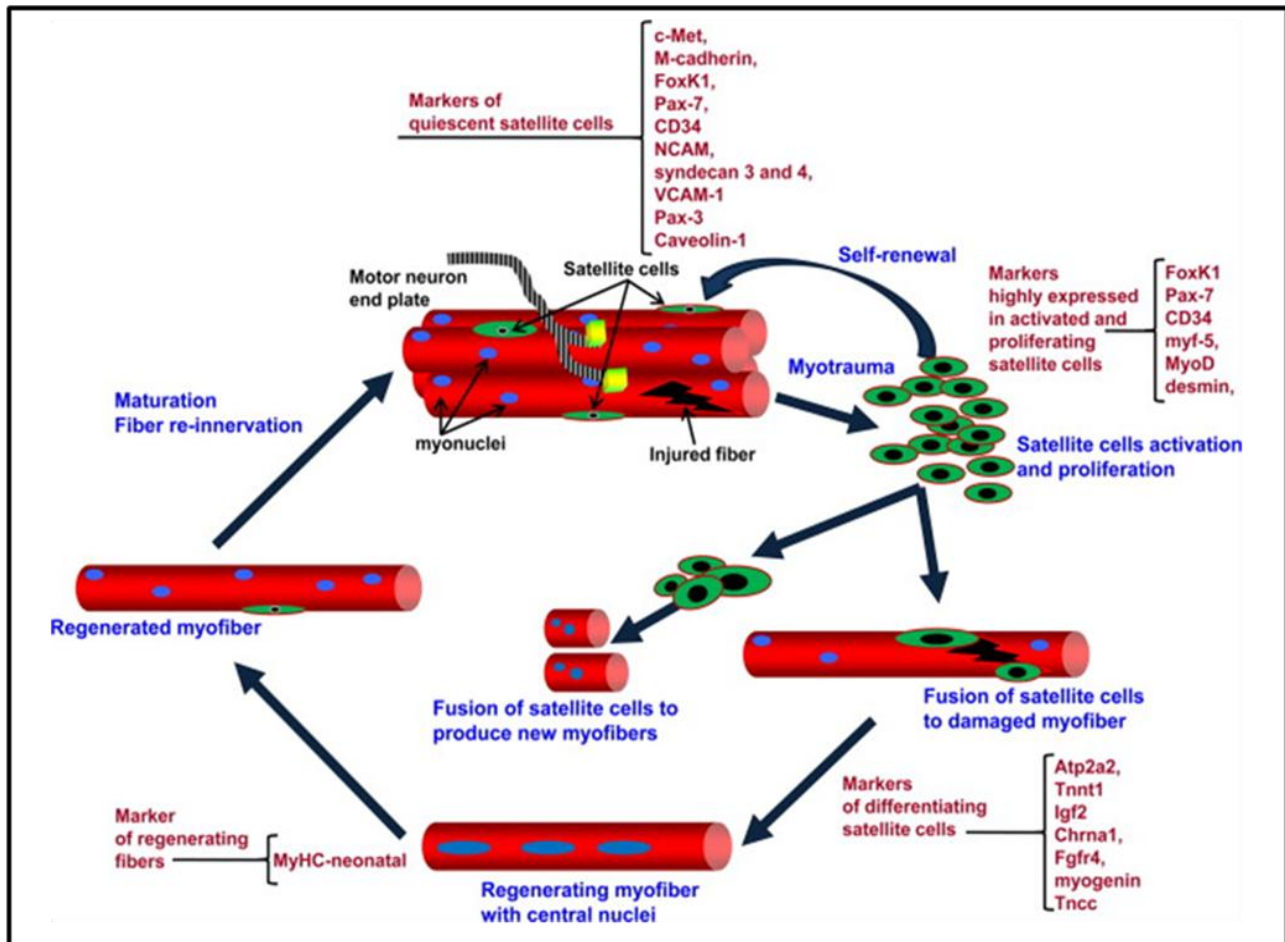


Figura 1.4 : *Rigenerazione del tessuto muscolare striato scheletrico mediante attivazione delle cellule satelliti.*

3. IL DIFFERENZIAMENTO MUSCOLARE

3.1 I MIOBLASTI COME SISTEMA MODELLO PER LO STUDIO DEI PROCESSI DI PROLIFERAZIONE E DIFFERENZIAMENTO MUSCOLARE

La proliferazione ed il differenziamento sono due processi cellulari strettamente collegati, mutualmente esclusivi, posti sotto il controllo di specifiche categorie di geni regolatori [65,66,67].

L'antagonismo tra i suddetti processi è evidente durante lo sviluppo, quando molti tipi cellulari non differenziano terminalmente se non dopo l'arresto irreversibile del ciclo cellulare. La controparte di tale situazione si riscontra invece nelle cellule tumorali, nelle quali la proliferazione incontrollata è associata alla perdita delle caratteristiche cellulari tipiche del differenziamento terminale [65,66,67,68,69].

Lo studio dei meccanismi di azione dei fattori di crescita e degli oncogeni cellulari e virali ha dato un forte contributo alla comprensione dei processi che governano l'esclusione reciproca tra proliferazione e differenziamento terminale. In particolare, sono stati ben caratterizzati diversi meccanismi molecolari che inibiscono i segnali differenziativi nelle cellule proliferanti e, viceversa, altri che impediscono la divisione mitotica in cellule differenziate [69,70,71].

In questo ambito, uno dei sistemi cellulari che ha fornito maggiori informazioni è sicuramente quello costituito dalle cellule muscolari scheletriche [70].

In questi modelli cellulari, la transizione da mioblasto precursore a fibra multinucleata è finemente regolata dall'espressione di geni specifici del differenziamento terminale, notevoli cambiamenti nella sintesi e nell'accumulo di proteine caratteristiche ed evidenti cambiamenti morfologici [65,66,70,71,72,73].

Lo stadio finale della miogenesi è la maturazione della fibra muscolare: nei miotubi contenenti centinaia di nuclei compaiono striature trasversali dovute all'assemblaggio delle miofibrille ed alla formazione dei sarcomeri; dopo pochi giorni in coltura, in condizioni di differenziamento, i miotubi diventano eccitabili e capaci di contrarsi spontaneamente. [65,66,67,72,73,]

Tale tipo di differenziamento è irreversibile, infatti i miotubi differenzianti non possono essere indotti a rientrare nel ciclo cellulare e proliferare anche se esposti ad alte concentrazioni di fattori di crescita. [65,66,67,72,73].

3.2 LE FASI DEL DIFFERENZIAMENTO MUSCOLARE

Il processo di miogenesi dei muscoli scheletrici di mammifero procede secondo tre fasi successive. La prima fase conduce alla determinazione dei mioblasti, i precursori delle cellule muscolari, segue poi una fase di proliferazione e, da ultimo, avviene il differenziamento in miociti maturi [74,75].

I mioblasti vengono direzionati verso il differenziamento muscolare scheletrico dall'azione di molteplici fattori di segnalazione extracellulari sia induttivi che inibitori, *Figura 1.5*.

I muscoli scheletrici nei vertebrati derivano da cellule progenitrici localizzate nei somiti. Essi sono costituiti da addensamenti di cellule mesodermiche, derivanti dalla condensazione del mesoderma parassiale e sono localizzati nell'embrione lateralmente al tubo neurale. Il mesoderma parassiale nel susseguirsi dello sviluppo embrionale viene suddiviso in compartimenti il dermamiotomo dorsalmente e lo sclerotomo centralmente [74,75].

Il dermamiotomo in seguito origina il dermatomo e il miotomo. Le cellule del miotomo dorsale sono deputate alla formazione della muscolatura del tronco, mentre le cellule del miotomo laterale migrano verso la gemma dell'arto in sviluppo, per dare origine alla muscolatura degli arti [74,75].

In un secondo momento, i mioblasti iniziano ad esprimere una classe di fattori di trascrizione, i fattori regolatori della miogenesi (MRFs), quindi escono dal ciclo cellulare bloccandosi in fase G₀/G₁, ed infine assumono le caratteristiche proprie dei miociti [65,66,67,71,72].

L'uscita dal ciclo cellulare è un requisito fondamentale per l'espressione di geni tessuto-specifici. Gli MRF espressi durante il differenziamento sono quattro e sono MyoD, Myf-5, miogenina e Myf-6 [65,66,70,71,76].

Myf-5, MyoD e Myf-6 possono agire come fattori determinanti della miogenesi direzionando le cellule progenitrici del programma miogenico. Myf-5 è trascritto per primo nelle cellule situate ai bordi del dermamiotomo, che in seguito delamineranno per formare il muscolo scheletrico del miotomo. MyoD è attivato più tardi nei progenitori ipoassiali ed epiassiali che contribuiscono a formare il miotomo maturo [69,72,73,74,77].

L'inizio del differenziamento è preceduto dall'espressione dell'MRF miogenina, indispensabile per il differenziamento terminale delle cellule e di MEF2 (Myocyte Enhancer Factor 2), componente di una famiglia di fattori che stimolano l'espressione di geni del differenziamento. I fattori MEF2 sono espressi in molti tessuti, alcune isoforme vengono indotte durante il differenziamento dei mioblasti, o in seguito all'espressione ectopica di MyoD o miogenina. I fattori MEF2 contengono un dominio MADS-box e un dominio MEF2 che cooperano nel mediare la dimerizzazione, il legame al DNA e l'interazione con co-fattori specifici [76,78].

Durante il differenziamento avviene anche la down-regolazione o inattivazione di alcuni fattori che sono regolatori negativi della miogenesi [65,68,70,71].

In vitro, la sequenza di eventi che porta al differenziamento a miotubi attivata con l'induzione della miogenina è correlata all'eliminazione dal medium di coltura dei fattori di crescita [70,73].

In questa fase le cellule, ancora proliferanti, sintetizzano DNA.

In seguito l'espressione di p21 provoca l'arresto del ciclo cellulare, mentre le cellule continuano ad esprimere miogenina. Ha inizio in questo momento il differenziamento fenotipico a miociti con induzione del fenotipo contrattile; assume particolare importanza in questa fase la sintesi di miosina, marker di differenziamento terminale [65,66,67,68,71,79].

Nell'ultima fase del differenziamento, le cellule fondono dando origine a miotubi multinucleati.

I segnali specifici che inducono la determinazione di ciascun gruppo di mioblasti vengono espressi solo in modo transiente. Questi segnali portano all'espressione di numerosi fattori intracellulari, in grado di mantenere il programma miogenico in assenza di fattori di induzione, *Figura 1.5* [65,66,73].

Esperimenti condotti sul differenziamento muscolare hanno fornito informazioni utili sui fattori di regolazione di tale processo, definendo alcuni meccanismi molecolari che inibiscono il differenziamento cellulare in cellule proliferanti, ed altri che inibiscono la proliferazione in cellule in differenziamento [66,67,71,68,69,79].

3.3 FATTORI CHE REGOLANO IL PROCESSO DI MIOGENESI

I fattori che regolano il processo di miogenesi (MRFs) sono membri di una superfamiglia di fattori trascrizionali del tipo helix-loop-helix (bHLH), di cui fanno parte anche c-myc e acheate-scute.

La famiglia MRFs comprende MyoD, Myf5, miogenina e Myf-6, *Figura 1.5* [65,66,70,71,74].

Questi geni codificano per proteine contenenti un dominio basico comune, deputato al legame con il DNA, ed un motivo helix-loop-helix (HLH) necessario per la formazione degli omo- o etero-dimeri con altre proteine cellulari.

In particolare, MyoD e Myf5 svolgono diverse funzioni durante la formazione dei muscoli scheletrici. Entrambe sono coinvolte nel direzionare le cellule dei somiti a mioblasti. Una volta divenute mioblasti, le cellule dei somiti sono in grado di proliferare ed attuare una self-renewal [66,67,77,78,80].

La miogenina e Myf-6, invece, sono considerati fattori induttori del differenziamento. La loro espressione infatti avviene solo in un secondo momento rispetto ai primi due, determinando il differenziamento terminale dei mioblasti e la formazione dei miotubi [66,67,73,81,82].

Sia in vitro che in vivo i MRFs formano degli eterodimeri con proteine coinvolte nella determinazione del destino cellulare e con una classe di proteine basiche del tipo HLH, non-miogeniche, note con il nome di E-proteine (E2A, E12, E47), ed i loro correlati HEB [65,66,75,76]. E' stato dimostrato che l'eterodimerizzazione è necessaria per la funzionalità dei MRFs in vivo.

Il sito di legame per l'eterodimerizzazione comprende una sequenza consenso (CANNTG), chiamata E-box, presente nelle regioni regolatrici di molti geni tessuto specifici e necessaria per la loro espressione [69,70].

Il legame al DNA e l'attività dei MRFs possono essere regolati negativamente da altre proteine bHLH quali Id e Twist che, legando i fattori miogenici bHLH o le proteine E, fungono da regolatori dominanti negativi. Queste proteine HLH come anche un ulteriore possibile inibitore della miogenesi, il recettore transmembrana Notch, potrebbero partecipare, nei primi stadi dello sviluppo, all'indirizzamento muscolare e al differenziamento [69,70,76].

Dal momento che la loro espressione coincide temporalmente con l'espressione dei fattori miogenici in alcuni tipi di cellule, è stato ipotizzato che l'inizio del processo miogenico sia regolato non solo da eventi di induzione, ma anche da meccanismi di derepressione.

Circa all'ottavo giorno dopo la fecondazione avviene l'attivazione del primo fattore, Myf5, che viene down-regolato intorno al quattordicesimo giorno di vita dell'embrione. Dopo otto giorni e mezzo si osserva l'espressione della miogenina, seguita dall'espressione di MyoD intorno al decimo giorno e mezzo e nel periodo in cui vengono espressi anche i markers di differenziamento terminale. Myf-6 è espresso in modo transiente tra il nono ed il dodicesimo giorno dopo la fecondazione, per essere poi silenziato subito dopo la nascita [75,76,82].

Il promotore specifico che regola l'espressione spazio-temporale dei MRFs non è ancora completamente definito. Sono stati tuttavia identificati elementi enhancer per MyoD e miogenina.

L'induzione dell'espressione del gene della miogenina sembra essere dipendente da un E-box.

L'espressione di MyoD durante l'embriogenesi è regolata da almeno due enhancer distinti: un primo elemento, localizzato 5 kb a monte del core della regione promotrice, dirige l'espressione del gene durante le fasi terminali del differenziamento dei precursori muscolari [82].

Un secondo elemento enhancer, individuato 20 kb a monte del sito di inizio della trascrizione di MyoD, dirige l'espressione del gene LacZ durante l'embriogenesi in specifici subdomini dei somiti. Alcuni studi indicano che specifici aminoacidi nel dominio bHLH presenti in tutti gli MRFs sono in grado di conferire la specificità miogenica. Questi residui, infatti, permettono il legame specifico dei complessi MRF-E2A alla famiglia delle proteine MEF (fattori di legame muscolo intensificanti). Questi fattori sono in grado di legare direttamente il DNA e fanno parte della famiglia dei fattori di trascrizione MADS [71,72,76,78].

I MEF contengono un breve tratto di aminoacidi in posizione C-terminale rispetto al dominio MADS, ed un dominio di attivazione della trascrizione. I MEF sono espressi anche in altri tessuti incluso il sistema nervoso centrale in sviluppo. Le isoforme specifiche muscolari di MEF2 riconoscono una sequenza conservata in alcuni geni tessuto specifici durante il differenziamento dei mioblasti o immediatamente dopo l'inizio dell'espressione di MyoD e miogenina.

In alcuni casi i geni muscolo specifici non contengono E-box, in altri casi gli E-box risultano indispensabili.

Si pensa però che MEF2 possa mediare l'attivazione di fattori miogenici bHLH indipendentemente dall'attivazione di E-box.

I siti per MEF2 sono presenti nelle regioni regolatorie non solo di geni muscolari a funzione strutturale, ma anche in geni MRF, ed è stato dimostrato che i primi sono indispensabili per l'espressione della miogenina e Myf-6. Questo suggerisce che MEF2 ed i regolatori della miogenesi bHLH sono coinvolti reciprocamente in un loop a feedback positivo [66,71,72,78,83].

L'interazione tra le due famiglie di fattori di trascrizione MRFs e MEF è anche in grado di attivare sinergicamente promotori muscolo-specifici. Questa cooperazione dipende da un'interazione diretta tra le due classi di proteine e permette l'attivazione di promotori contenenti entrambi i siti E-box e MEF2, oppure uno solo dei due [65,66,78].

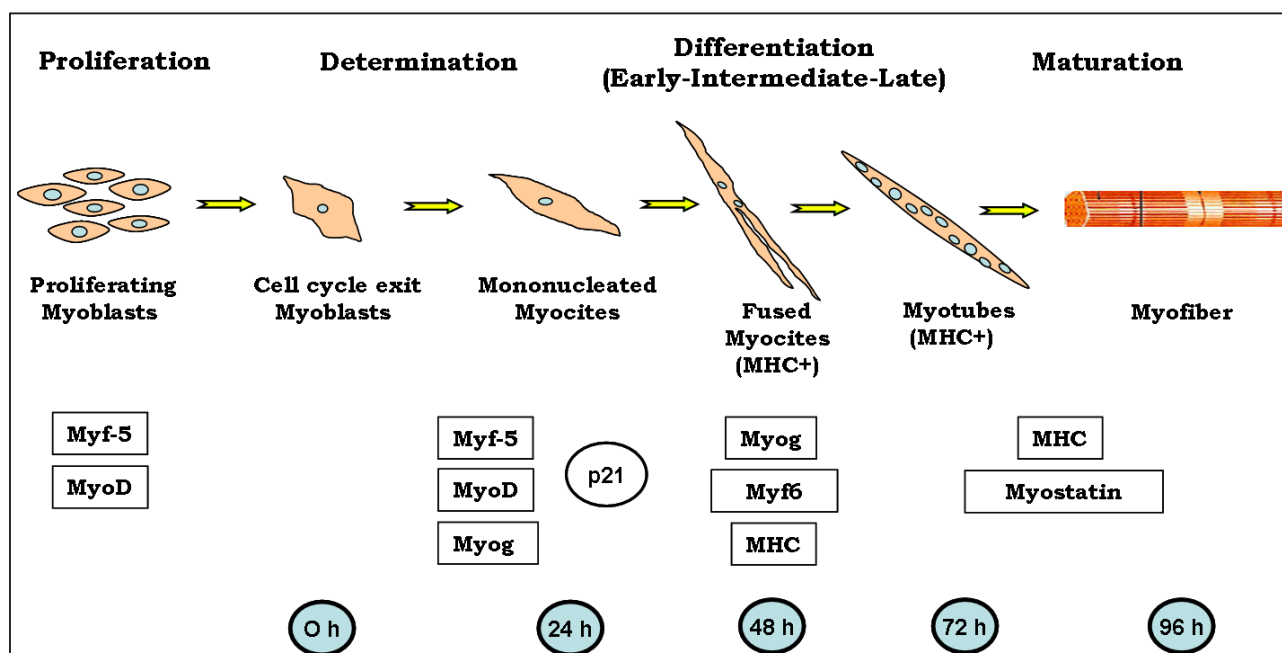


Figura 1.5 : *Fasi del processo di differenziamento muscolare scheletrico con i Fattori di Regolazione Miogenica.*

3.4 FATTORI TRASCRIZIONALI Pax

La famiglia di fattori trascrizionali denominata Pax (Paired-box transcription factors) svolge una funzione importante nella regolazione dello sviluppo e del differenziamento di diversi tipi cellulari durante l'embriogenesi. Di notevole rilevanza il ruolo di Pax3 e Pax7 nella formazione del muscolo scheletrico durante lo sviluppo e nella rigenerazione nell'adulto [63,65,66,67,74,83,84].

Recentemente, nel muscolo in via di sviluppo, è stata identificata una popolazione di cellule Pax3⁺/Pax7⁺ che dà origine a cellule miogeniche caratterizzate dall'espressione di MyoD e Myf-5, costituendo così una riserva di cellule progenitrici miogeniche durante lo sviluppo embrionale e fetale. Alla fine dello sviluppo muscolare fetale, questi progenitori Pax3⁺/Pax7⁺ vanno a localizzarsi sotto la lamina basale che si forma intorno alle fibre muscolari, assumendo così la posizione caratteristica delle cellule satelliti nel muscolo scheletrico post-natale. Nel muscolo adulto, le cellule satelliti permangono in uno stato quiescente, sotto la lamina basale delle fibre muscolari, ma se il muscolo viene danneggiato e la lamina si rompe, vengono attivate andando incontro a proliferazione, self-renewal e differenziamento in nuove fibre muscolari [84]. Tutte le cellule satelliti quiescenti sono caratterizzate dall'espressione di Pax7 mentre quella di Pax3 è limitata ad alcuni muscoli [84,85,86,87].

Durante lo sviluppo Pax3 è coinvolto nella migrazione dei mioblasti embrionali verso l'abbozzo degli arti. Pax3 può attivare in maniera diretta Myf-5 e MyoD, iniziando così il differenziamento miogenico. L'espressione di Pax3 nelle cellule satelliti viene indotta durante gli stadi iniziali dell'attivazione della proliferazione, in seguito la proteina Pax3 viene mono-ubiquitinata e degradata, suggerendo che, benché Pax3 regoli l'attivazione iniziale delle cellule satelliti, la sua repressione è necessaria per il differenziamento dei mioblasti [85,86,87].

Pax7 può attivare la trascrizione nelle cellule satelliti quiescenti ed in quelle che adottano un fenotipo self-renewal e può influenzare il destino delle cellule satelliti controllando l'espressione dei fattori regolatori miogenici: Pax7 infatti modula l'espressione di Myf-5 e MyoD e l'attività trascrizionale di Pax7 è necessaria per mantenere l'espressione di MyoD [87,88,89].

E' infatti stato dimostrato che Pax7 è in grado di indurre modificazioni nella cromatina e quindi può stimolare l'attività trascrizionale dei geni bersaglio interagendo con proteine del complesso delle metiltrasferasi istoniche. Pax7 è raramente co-espresso con miogenina e, nelle cellule satelliti attivate, l'espressione costitutiva di Pax7 ritarda l'induzione dell'espressione di miogenina. Nei fibroblasti C3H10T1/2 convertiti in mioblasti tramite l'espressione esogena di MyoD, la sovra-espressione di Pax7 previene l'induzione dell'espressione di miogenina, mentre la sovra-espressione di miogenina regola negativamente Pax7 [88,89].

Nei topi Pax7^{-/-} le cellule satelliti sono presenti in numero ridotto e diminuiscono ulteriormente durante lo sviluppo post-natale. I mioblasti derivati da questi modelli murini presentano disordini nei processi di proliferazione [90] e differenziamento, mentre l'espressione del mutante dominante negativo Pax7 porta alla morte dei mioblasti [88,89].

Pax7 sembra quindi ricoprire un ruolo centrale nella modulazione dell'espressione dei fattori regolatori miogenici, mantenendo la proliferazione e prevenendo un differenziamento miogenico precoce [86,87,88,90].

3.5 COORDINAZIONE DEI FATTORI DI REGOLAZIONE MIOGENICA

I fattori miogenici sono regolati da un considerevole numero di attivatori e repressori.

Un gruppo di proteine con attività inibitoria nei confronti degli MRF è rappresentato dalla famiglia Id (inhibitor of DNA binding). La famiglia di proteine Id, appartenenti al gruppo di proteine bHLH, include quattro membri: Id1, Id2, Id3, identificata come il corrispettivo murino HLH462 e Id4.

Le proteine Id contengono un dominio HLH che ha la capacità di formare eterodimeri con i domini HLH dei fattori di trascrizione miogenici. L'assenza del dominio basico nelle proteine Id e l'incapacità di legarsi al DNA suggeriscono un ruolo di questa famiglia nella regolazione negativa dei fattori trascrizionali HLH. E' stato dimostrato che il primo membro della famiglia Id scoperto, Id1, si trova in vitro in associazione con le proteine ubiquitarie E12 ed E47 e, in misura minore, con MyoD. La presenza delle proteine Id previene il legame a E-box, sia da parte degli omodimeri E, sia da parte degli eterodimeri MyoD-proteine E [91].

I complessi proteine E-Id sono stati ritrovati in vivo in mioblasti non differenziati. Inoltre l'overespressione delle proteine Id inibisce l'attivazione trascrizionale dipendente da MyoD in trasfezioni transienti, in trasfezioni stabili ritarda il pattern differenziativo [91,92].

Elevati livelli di proteine Id sono generalmente presenti in cellule proliferanti e in cellule agli stadi più precoci del differenziamento [91,92,93].

E' stato osservato che l'espressione dei geni Id è notevolmente ridotta in cellule a cui viene ridotto il siero di coltura, o in cui viene indotto il differenziamento.

La down-regolazione di proteine Id quindi permette la formazione di complessi attivi in grado di legare il sito E-box ed attivare geni muscolo specifici.

Un ruolo inibitore è svolto anche dal fattore murino twist (mTwist), il quale ha la capacità di sequestrare le proteine del gruppo E, impedendo la formazione degli eterodimeri funzionali [94].

Altri inibitori svolgono invece un ruolo più specifico, alcuni di essi infatti agiscono solo su un particolare membro della famiglia dei fattori miogenici. Il fattore Mist1 agisce, per esempio, formando dimeri con MyoD ed inibendone la funzionalità. Il meccanismo con cui proto-oncogeni nucleari interferiscono con il differenziamento miogenico potrebbe dipendere dalla loro capacità di mediare la risposta nucleare ai fattori di crescita [95].

L'espressione di diversi proto-oncogeni come c-fos, c-jun, c-myc, diminuisce in concomitanza con l'espressione dei geni del differenziamento, suggerendo non solo l'incompatibilità dell'espressione costitutiva di questi geni con il programma differenziativo, ma anche un ruolo attivo dei proto-oncogeni nella regolazione negativa del programma di attivazione precoce nei mioblasti proliferanti [96].

Per quanto riguarda la proteina Jun sono stati proposti due meccanismi di inibizione del differenziamento muscolare. Uno di questi prevede l'interazione diretta di Jun con MyoD, mediante un meccanismo di competizione tra Jun e le proteine E per il legame con MyoD. Il secondo meccanismo proposto vede una competizione tra i co-regolatori trascrizionali dell'attività di MyoD [97].

Il possibile ruolo di c-myc nell'inibizione del processo differenziativo muscolare non è ancora stato chiarito, anche se le caratteristiche nella struttura del proto-oncogene (la presenza sia di una regione HLH sia di domini a leucine zipper, la regolazione dell'espressione di c-myc in risposta a stimoli proliferativi o differenziativi) volgono a favore di questa ipotesi [98].

I mioblasti in coltura esprimono generalmente MyoD o Myf5 o entrambi prima di essere indotti al differenziamento. La conversione miogenica in vitro è favorita dalla riduzione di siero nel medium di coltura e dall'arrestarsi della proliferazione cellulare, mentre alcuni fattori presenti nel terreno di coltura giocano un ruolo importante nella regolazione degli MRF [73].

Diversi studi supportano l'importanza del fattore di crescita dei fibroblasti (FGFs), del fattore di crescita trasformante (TGF) e di un fattore di crescita insulino-simile (IGFs) nella regolazione del differenziamento miogenico. L'FGF ed in particolare il bFGF e il TGF sono due potenti inibitori, mentre l'insulina e l'IGF sono potenti stimolatori della miogenesi in diverse linee cellulari e colture primarie. La distribuzione di questi fattori di crescita nei tessuti embrionali ed il pattern di espressione dei recettori corrispondenti nei precursori muscolari supporta l'idea che questi fattori svolgano un ruolo importante nello sviluppo muscolare in vivo [99,100,101].

In alcuni casi, in base sia al tipo di linea cellulare considerata, sia al tipo di stimolo proliferativo utilizzato, l'espressione costitutiva dei proto-oncogeni come ras e fos o il trattamento con FGF o TGF β , reprime la trascrizione dei fattori miogenici come MyoD [98,99,100,101,102].

Oltre all'interazione diretta tra fattori miogenici e proteine inibitorie come Id o Jun, anche le modificazioni post-traduzionali possono essere legate alla modulazione dell'attività dei MRFs. In particolare è stato studiato lo stato fosforilato di queste proteine [98].

E' noto che diversi fattori di crescita e oncogeni possano indurre l'attività di serina-treonina chinasi appartenenti alla famiglia delle Protein Chinasi C (PKC). E' stato ipotizzato un ruolo di PKC nei fenomeni di regolazione degli MRFs, dal momento che l'attivazione di PKC da parte degli esteri del forbolo unitamente all'espressione costitutiva della subunità catalitica α della chinasi sono in grado di interferire nel differenziamento muscolare [65,103].

Alcuni studi hanno proposto una fosforilazione diretta degli MRFs da parte di PKC con un meccanismo simile a quello tramite cui FGF attua il proprio effetto inibitorio [103].

Queste osservazioni sono supportate dal fatto che la PKC, come FGF, previene il legame tra la miogenina ed il DNA attraverso la fosforilazione di un residuo di treonina all'interno del dominio basico del MRF [103,104].

Inoltre FGF non induce una fosforilazione dei MRFs negli stessi siti in cui avviene la fosforilazione ad opera di PKC. Ciò suggerisce che i differenti fattori miogenici possono essere regolati in diversi modi da modificazioni post-traduzionali, e che i fattori di crescita possono interferire nel processo differenziativo tramite diversi pathways [104].

Anche la Protein Chinasi A (PKA) è in grado di interferire con i fattori miogenici poiché, in vitro, questi ultimi possono essere fosforilati dalla serina-treonina chinasi che inibisce il loro legame al DNA [105].

3.6 RELAZIONI MOLECOLARI E FUNZIONALI TRA CICLO CELLULARE E DIFFERENZIAMENTO MUSCOLARE

A livello cellulare il processo di formazione delle fibre muscolari è caratterizzato da una sequenza di eventi dovuti all'interazione tra il processo di proliferazione e quello di differenziamento che coinvolge l'attività dei fattori miogenici. Questi infatti, una volta attivati, iniziano il programma di differenziamento e contemporaneamente inducono l'inibizione della proliferazione cellulare.

Negli ultimi anni sono stati messi in evidenza alcuni dei meccanismi molecolari che legano l'attività dei geni regolatori del differenziamento muscolare al controllo del ciclo cellulare. Questi meccanismi molecolari riguardano principalmente la regolazione di cicline e chinasi ciclina-dipendenti (Cyclin Dependent Kinases : CDK) e l'attività dei fattori pRb e MyoD durante la miogenesi [65,68,70,79,106].

3.6.1 REGOLAZIONE DI CICLINE E CHINASI CICLINA-DIPENDENTI DURANTE LA MIOGENESI

L'espressione dei regolatori positivi della progressione del ciclo cellulare, cicline e chinasi ciclina-dipendenti, è finemente regolata durante il differenziamento miogenico [65,68,79,106].

Sono state descritte differenti cicline e chinasi ciclina-dipendenti che agiscono in maniera sinergica nel controllo della progressione del ciclo cellulare e di altri processi metabolici cellulari.

Le cicline, e per estensione le chinasi ciclina-dipendenti, possono essere suddivise in tre gruppi: le cicline G1, responsabili della progressione del ciclo durante la fase G1 e l'ingresso in fase S; le cicline mitotiche, regolatrici dell'inizio della mitosi cellulare; e le cicline aventi ruoli regolativi non direttamente collegati alla progressione del ciclo cellulare. Quest'ultimo gruppo non segue la classificazione tipica, ma è composto da diverse cicline e relative chinasi regolatrici aventi ruoli molto importanti nella miogenesi [65].

Il gruppo delle cicline G1 include le cicline D e E, responsabili dell'attivazione delle chinasi CDK4 (ciclina D), CDK6 (ciclina D) e CDK2 (ciclina D e E) [65,106].

Le cicline mitotiche A e B sono responsabili dell'attivazione delle chinasi CKD2 (ciclina A) e CDK1 (ciclina B). I livelli di espressione di queste cicline sono regolati da meccanismi intrinseci al ciclo cellulare, eccezion fatta per la Ciclina D, la cui espressione è ampiamente regolata da segnali estrinseci, quali i fattori di crescita [65,68].

In tutti i tipi cellulari, le cicline G1 e le cicline mitotiche con le relative chinasi ciclina-dipendenti regolano la progressione del ciclo cellulare e la proliferazione. Uno dei più importanti meccanismi

di controllo della progressione del ciclo cellulare è la fosforilazione della proteina del retino blastoma (Rb) finemente regolata dalle chinasi ciclina-dipendenti. Se fosforilata, Rb non è in grado di legare e quindi inibire l'attività della famiglia di fattori di trascrizione E2F, la cui attività guida la progressione del ciclo cellulare [107].

Inoltre, nei mioblasti proliferanti, le chinasi ciclina-dipendenti esercitano un ulteriore ruolo nella prevenzione del differenziamento precoce. Il complesso Ciclina E/CDK2 e il complesso Ciclina D/CDK4 possono bloccare il processo differenziativo e l'attività trascrizionale di MyoD (*Figura 1.6*).

Il complesso Ciclina E/CDK2 può reprimere l'espressione genica indotta da MyoD mediante il controllo dei livelli di fosforilazione di Rb [65,68,107].

L'espressione della maggior parte delle cicline (Ciclina D1, C, E, A e B) è rapidamente repressa con l'inizio del processo di differenziamento, quando le cellule si arrestano nella fase G1 del ciclo cellulare [65,106,108].

Un'eccezione è costituita dalla Ciclina D3, la cui espressione viene invece indotta nel corso del differenziamento muscolare [65,106,108].

Questa osservazione è sorprendente dato che Ciclina D3, così come le altre cicline, promuove la progressione del ciclo cellulare attivando l'attività delle CDK. Tuttavia, è stato dimostrato che la Ciclina D3 è espressa ad alti livelli non solo durante il differenziamento terminale di linee di mioblasti in coltura ma anche in vivo nel muscolo scheletrico murino durante gli ultimi stadi dello sviluppo fetale e le prime settimane della vita post-natale, quando le cellule muscolari hanno raggiunto la quiescenza e l'espressione della Ciclina D1 risulta inibita [65,68,79,106,108].

Lo stretto legame esistente tra l'arresto del ciclo cellulare e l'induzione del differenziamento miogenico, è testimoniato anche dalla spiccata induzione di regolatori negativi della proliferazione. In particolare, in una fase precoce del differenziamento, in concomitanza con l'induzione di miogenina, è stato evidenziato un forte incremento dei livelli degli inibitori delle chinasi ciclina-dipendenti (CKI) p21, p27, p57 e p18 [65,109].

E' stato dimostrato che la trascrizione del gene p21 è indotta direttamente da MyoD e che la proteina p21 nelle cellule muscolari differenziate, è associata con le CDK e ne inibisce l'attività, contribuendo così all'arresto del ciclo in fase G1 [110].

Dati ulteriori hanno suggerito che p21, in cellule muscolari differenziate, cooperi con pRb per garantire l'assenza di replicazione del DNA e mantenere quindi lo stato post-mitotico [65,68,79].

Un altro inibitore di CDK fortemente indotto durante il differenziamento miogenico è p18 [65]. Nei miotubi terminalmente differenziati, p18 è associato con CDK4 e CDK6 a formare complessi

funzionalmente inattivi, ciò evidenzia un suo ruolo nel mantenimento dell'arresto della proliferazione. Il meccanismo di induzione di p18 resta però ancora da chiarire.

E' stato dimostrato, inoltre, che nel corso del differenziamento muscolare, viene incrementata l'espressione del gene oncosoppressore retinoblastoma [65,107,108], e che la proteina pRB si accumula nella sua forma ipofosforilata, attiva nell'inibizione della proliferazione [65,107,108].

3.7 RUOLO DI pRb NELL'ARRESTO DEL CICLO CELLULARE E NEL DIFFERENZIAMENTO MUSCOLARE

pRb svolge un ruolo centrale nel controllo del ciclo cellulare: la sua funzione è quella di integrare vari segnali extra-cellulari ed indirizzare la cellula verso la fase S o verso la fuoriuscita dal ciclo cellulare (fase G₀), *Figura 1.6* [65,107].

Rb è una fosfoproteina nucleare espressa ubiquitariamente che agisce come soppressore della crescita cellulare. La sua fosforilazione è regolata durante il ciclo: nella fase G₀/G₁ pRb si trova in una forma defosforilata o ipofosforilata, mentre durante la progressione verso la fase S viene progressivamente fosforilata dai complessi ciclina-CDK [65,68,106]; pRb viene quindi defosforilata da specifiche fosfatasi durante la mitosi [65,111]. Nella fase G₁, la fosforilazione di alcuni residui specifici di pRb, catalizzata dai complessi ciclina-CDK4/CDK6, elimina l'attività antiproliferativa di pRb e permette il superamento del punto di restrizione [65,107,111].

Gli effetti di pRb sulla crescita sono mediati dalla sua interazione fisica e funzionale con molecole importanti nella regolazione del ciclo cellulare [111]. Una delle interazioni maggiormente studiate è quella con la famiglia dei fattori di trascrizione E2F: pRb lega E2F solo quando si trova nella sua forma ipofosforilata, mentre la fosforilazione di pRb causa la distruzione di tale legame e la liberazione dei fattori E2F [111,112].

L'interazione pRb/E2F previene l'attivazione trascrizionale di diversi geni coinvolti nella transizione alla fase S del ciclo cellulare. La capacità di Rb di inibire l'entrata in fase S è regolata durante il ciclo cellulare dalla sua fosforilazione ad opera della chinasi ciclina dipendente della fase G₁ [107,111,112].

Oncoproteine tumorali virali, quando espresse in colture cellulari di mioblasti, hanno la capacità di inibire il processo miogenico e l'analisi genetica ha dimostrato che questo ruolo è dovuto al loro legame con le proteine della famiglia Rb [65,111].

Il ruolo critico di pRb nel differenziamento delle cellule muscolari è stato originariamente suggerito da studi che miravano a chiarire i meccanismi tramite cui gli oncogeni dei virus a DNA inibiscono il differenziamento muscolare. E' stato dimostrato che le oncoproteine virali Large T di SV40 ed

E1A di adenovirus inducono la sintesi di DNA nei nuclei dei miotubi interagendo con pRb ed inibendone l'attività [113].

Infatti il legame di Large T o E1A alla proteina pRb determina il rilascio dei fattori di trascrizione E2F, i quali riattivano l'espressione delle cicline E ed A, spingendo così la cellula ad entrare nella fase S. La capacità dei miotubi differenziati di riattivare il ciclo cellulare suggerisce anche che l'apparato proliferativo basale non è stato irreversibilmente perso ma viene attivamente inibito. [65,66,67,71,72,75].

Un'evidenza diretta della dipendenza del differenziamento dei mioblasti da Rb è data dall'incapacità dei fattori miogenici di indurre il differenziamento in cellule mancanti di Rb [115].

Anche la proteina p107 ha effetti simili a Rb, suggerendo che diversi membri della famiglia di Rb, sebbene funzionalmente differenti, possono avere ruoli simili nel differenziamento muscolare. A supporto di questa ipotesi si è osservato che mioblasti di topi mutanti per Rb sono in grado di formare miotubi in seguito all'overespressione di p107 [114,115].

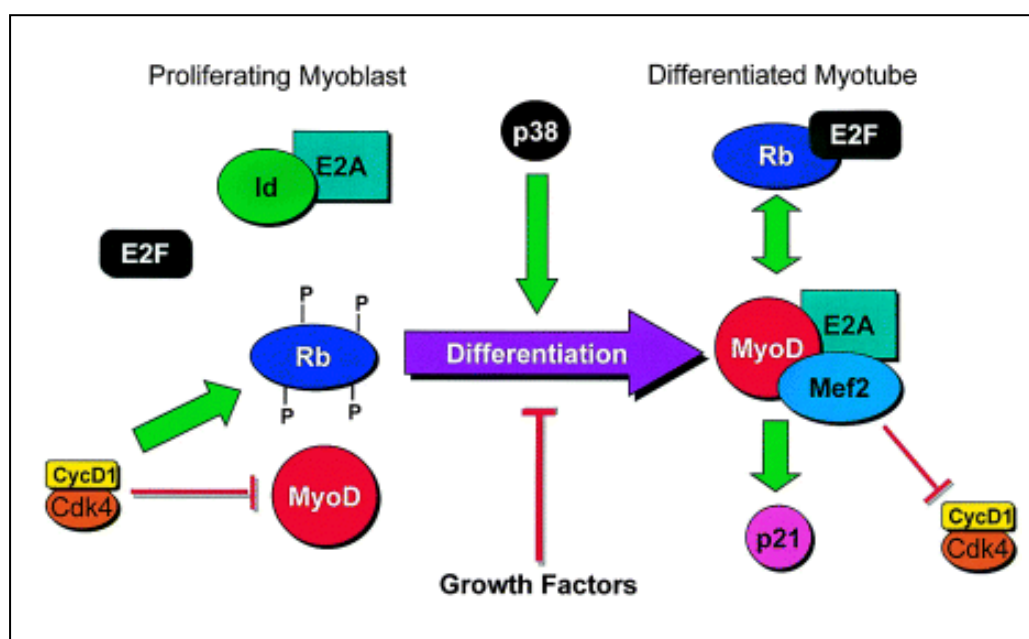


Figura 1.6 : *Correlazione tra l'attività della famiglia genica MyoD ed il controllo del ciclo cellulare.*

4. IPERTROFIA MUSCOLARE SCHELETRICA

Le fibrocellule muscolari, una volta differenziate, perdono la capacità di dividersi e il loro numero è pressoché stabile e definito nel tempo. Il tessuto muscolare, però, è caratterizzato dal possedere una notevole plasticità (capacità di modificare il fenotipo o le proprietà delle sue cellule), infatti, è soggetto a continui cambiamenti dovuti al processo di invecchiamento, alle richieste d'uso nonché a particolari regimi d'attività fisica variamente somministrati.

Con l'avanzare dell'età, si ha perdita di massa muscolare a causa della riduzione delle dimensioni e non del numero delle fibre muscolari. Tale fenomeno pare coinvolgere soprattutto le fibre di tipo II, mentre si assiste ad un incremento dell'area relativa delle fibre di tipo I. Il processo di invecchiamento, inoltre, comporta un aumento della quota connettivale con la conseguente riduzione della forza prodotta per unità di area di sezione trasversa muscolare.

L'esposizione di un muscolo a disuso prolungato, per esempio a seguito di infortuni o patologie, determina notevole ipotrofia delle fibre di tipo I e II, più spesso attivate durante le attività giornaliere e, pertanto, maggiormente sensibili all'inattività [116,117].

In seguito a specifiche richieste d'uso, le fibre muscolari possono andare incontro a significative alterazioni morfologiche, biochimiche e funzionali. La risposta di adattamento delle fibre muscolari all'allenamento di resistenza (attività fisica che porti la frequenza cardiaca tra il 60 e l'80% del suo valore massimo per almeno 20-30 minuti) consiste principalmente in un incremento delle capacità metaboliche e della resistenza allo sforzo, che trae origine dall'aumento della densità mitocondriale e dell'attività di enzimi coinvolti in processi ossidativi [118].

Un allenamento di potenza (per es. il sollevamento pesi), intenso e regolare, caratterizzato da ripetizione di sforzi oltre l'80% della massima contrazione volontaria, promuove l'ipertrofia delle fibre muscolari che vengono attivate.

Durante l'allenamento anaerobico, il lavoro muscolare compiuto per sostenere e sollevare carichi di notevole entità, porta ad un aumento dell'area della sezione trasversa delle singole fibre muscolari, probabile risultato di un incremento della sintesi proteica. Sia il muscolo cardiaco che il muscolo scheletrico tendono ad adattarsi ad un regolare incremento del carico di lavoro, attraverso l'accrescimento della propria massa. Il muscolo cardiaco diviene, così, in grado di pompare più efficientemente il sangue in circolo, il muscolo scheletrico, invece, acquisisce la capacità di generare maggiore forza durante la contrazione. Il muscolo che viene sovraccaricato aumenta il proprio diametro per mantenere una velocità di contrazione costante per carichi sempre maggiori. Nelle cellule muscolari soggette a stimoli di carico progressivo, inoltre, si accrescono i depositi di CP, ATP e glicogeno, modificazioni vantaggiose per l'esecuzione di sforzi brevi ma intensi, tipici

dell'attività anaerobica. Le alterazioni a carico delle miofibrille si accompagnano alla produzione di nuovo tessuto connettivo a livello di tendini e legamenti, con conseguente irrobustimento e maggiore protezione nei confronti di carichi massimali. L'allenamento anaerobico di potenza, quindi, comporta un incremento di materia contrattile e di composti chimici ad alto contenuto energetico, non induce, invece, processi angiogenetici né alterazioni a carico dei mitocondri, organuli il cui lavoro di centrali energetiche, strettamente legato all'ossigeno, non è particolarmente stimolato dall'attività anaerobica. Dal punto di vista meccanico gli esercizi di potenza provocano un innalzamento della velocità di produzione di forza durante le contrazioni isometriche e della potenza durante le contrazioni isotoniche [116,117,118].

4.1 MECCANISMI MOLECOLARI COINVOLTI NELLA GENESI DI IPERTROFIA MUSCOLARE

Nel 1990, De Vol e collaboratori hanno dimostrato, in un modello sperimentale in vivo, che all'aumentare della sezione trasversa dei muscoli soleo e plantare di ratto, si osserva un incremento dell'espressione del fattore di crescita IGF-1 (Insulin-like Growth Factor-1), la cui somministrazione è, tra l'altro, sufficiente a indurre ipertrofia nel muscolo scheletrico di ratto. Inoltre, IGF-1 sembra avere un ruolo determinante nel prevenire, nel topo, l'atrofia muscolare causata dall'angiotensina II [119]. Studi recenti hanno indotto ad ipotizzare che IGF-1 promuova la genesi dell'ipertrofia muscolare attraverso l'innescò della via di trasduzione del segnale PI3K-AKT/-mTOR:

- Incubazione di miociti murini (C2C12) con IGF-1, infatti, induce l'attivazione di tale via citosolica [120].
- Cellule C2C12, transfettate con il gene codificante per la proteina AKT in forma attiva, appaiono ipertrofiche all'analisi fluocitometrica [120].

La proteina mTOR (mammalian target of Rapamycin) è una molecola di 290 KDa, così chiamata perché inibita dal macrolide rapamicina, antibiotico prodotto dal batterio *Streptomyces hygroscopicus*. La rapamicina e i suoi derivati presentano un unico meccanismo d'azione che comporta l'interazione con una piccola molecola proteica dal peso di 12 KDa, nota come FKBP12 (FK506-binding protein) a formare un complesso che si va a legare ad mTOR, inibendola. Il complesso mTORC1 è responsabile della regolazione della sintesi proteica e si compone di mTOR, raptor (regulatory associated protein of mTOR) ed GβL. Raptor è una grossa molecola di 150 KDa, che stabilisce interazioni multiple con mTOR e con suoi substrati; GβL, invece, è una proteina di 36 KDa, che si lega al dominio chinasi di mTOR, regolandone positivamente l'attività catalitica. Il

complesso mTORC2 è costituito da mTOR, GβL e da una proteina dal peso molecolare di circa 200 KDa, nota come rictor (rapamycin-insensitive companion of mTOR) [121,122,123].

La funzione fisiologica di mTORC2 non è ancora del tutto chiara, tuttavia l'ipotesi ad oggi più accreditata è che tale complesso moduli l'organizzazione dell'actina citoscheletrica [124].

mTOR è una serin-treonin chinasi costituita da un dominio catalitico, un sito di legame per il complesso FKBP12-rapamicina ed un probabile dominio ad azione auto-inibitoria (negative regulatory domain). Nelle cellule eucariotiche, mTOR forma due distinti complessi multimerici, mTORC1, sensibile all'azione inibitoria della rapamicina, e mTORC2 [123].

La chinasi mTOR promuove la sintesi di nuove molecole proteiche mediante fosforilazione di due diversi substrati: 4E-BP1 (initiation factor 4E binding protein), e p70S6k [125].

La proteina 4EBP1, nota anche come PHAS-1 (proteina di tipo 1 fosforilata dal calore ed acido-stabile), lega il fattore di inizio della traduzione eIF4E rendendolo inattivo; a seguito di fosforilazione ad opera di mTOR, 4EBP1 si dissocia dal fattore eIF4E che, pertanto, può dare inizio al processo di traduzione [126].

La proteina p70S6k (70 KDa) è un membro della famiglia delle AGC chinasi, di cui fanno parte anche PKC, PKA, AKT, PDK1. L'attivazione di tale chinasi, sembra aver luogo attraverso una complessa serie di cambiamenti conformazionali e di reazioni di fosforilazione, secondo il seguente schema:

Step1: rottura del ponte intracatenario tra il dominio C-terminale e il dominio N-terminale di S6k1;

Step2: fosforilazione dei residui C-terminali Ser-411, Ser-418, Ser-424 e Thr-421;

Step3: fosforilazione della Thr-389 (dominio idrofobo) da parte dell'm-TOR;

Step4: fosforilazione del residuo Thr-229 da parte di PDK1.

Una volta attivata, la chinasi p70S6k fosforila la proteina ribosomale S6 con conseguente trascrizione del gruppo degli m-RNA 5'-TOP (Terminal Oligo-Pyrimidine) che codificano fattori di allungamento necessari per la sintesi proteica [127].

L'attività della proteina mTOR e dei suoi target è modulata da numerosi stimoli, quali fattori di crescita (IGF-1), nutrienti, stress ambientali (ipossia) [128], ormoni (insulina, T3, GH, testosterone) [129] e secondi messaggeri (IP3, Ca⁺⁺) [130].

Va sottolineato che la comprensione dei meccanismi molecolari che inducono la genesi dell'ipertrofia muscolare è il presupposto necessario per lo sviluppo di farmaci e strategie terapeutiche da affiancare ai normali piani di riabilitazione motoria nel trattamento dell'ipotrofia del muscolo scheletrico, conseguente a patologie miasteniche o a disuso.

4.1.1 FATTORI DI CRESCITA

Il legame del fattore di crescita IGF-1 al proprio recettore (IGFR) innesca una cascata enzimatica intracellulare lungo la quale si ha l'attivazione, tramite fosforilazione, della proteina PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) che porta alla formazione di IP3 (fosfatidilinositolo-3,4,5-trifosfato). Questi, a sua volta, fornisce un sito di legame alla membrana per la proteina AKT o PKB (protein-chinasi B), la quale viene quindi fosforilata da parte della chinasi PDK-1. Dopo essere stata attivata, la proteina AKT può fosforilare una serie di substrati, tra cui proteine che mediano la sintesi proteica, la trascrizione genica e la proliferazione cellulare (*Figura 1.7*).

Dati riportati in letteratura [131,132] suggeriscono che il processo che conduce all'ipertrofia muscolare potrebbe essere innescato da contrazioni rapide ed improvvise responsabili di microlesioni a carico delle fibrocellule muscolari. A ciò seguirebbero processi riparativi ad opera delle cellule muscolari satellite, cellule mononucleate totipotenti che rimangono in uno stato di quiescenza finché stimoli, tra cui anche stress meccanici, non ne determinino l'attivazione. Una volta attivate, le cellule satellite proliferano, generando mioblasti che differenziano e, fondendosi con le fibre muscolari lese, rigenerano cellule multinucleate. L'aumento del numero di nuclei permetterebbe a tali cellule di incrementare notevolmente la sintesi proteica, producendo nuove proteine contrattili (actina e miosina) e più recettori per agenti stimolanti quali gli androgeni (ormoni dalla nota azione anabolica). Questo insieme di processi contribuirebbe all'accrescimento della massa muscolare che si sviluppa in seguito ad allenamento. Tra i promotori dell'attivazione delle cellule satellite un posto di rilievo spetterebbe al fattore di crescita locale, MGF (Mechano Growth Factor), isoforma dell'IGF-1 espressa dalle cellule muscolari in risposta a stimoli meccanici [134]. Il suddetto fattore di crescita favorirebbe la riparazione del tessuto muscolare microleso, attraverso un'azione autocrina responsabile dell'attivazione delle cellule satellite [132,133] e del conseguente aumento dell'area della sezione trasversa del muscolo. La perdita di massa muscolare che si osserva nell'invecchiamento [135] e in patologie, come la distrofia muscolare di Deuchenne, sarebbe, invece, caratterizzata dalla incapacità di produrre MGF in risposta a stimoli meccanici [132,133].

Per spiegare il *modus operandi* dell'IGF-1 (o dell'isoforma MGF), sono state avanzate due ipotesi:

A) mobilitazione del calcio e attivazione della via di trasduzione del segnale calcineurina-dipendente con induzione del fattore di trascrizione NFAT [136].

B) legame con uno specifico recettore di membrana (IGFR) dotato di attività tirosin-chinasica, fosforilazione della proteina IRS-1 (*Insulin Receptor Substrate-1*) e innesco della via di trasduzione del segnale PI3K/AKT/mTOR [120,137].

I risultati ottenuti mediante esperimenti condotti su mioblasti C2C12, derivanti da cellule satellite di topi adulti, transfettate con un plasmide codificante l'IGF-1 [138], hanno indotto ad ipotizzare che l'IGF-1 possa innescare la mobilitazione del calcio intracellulare mediante attivazione della calcineurina. La calcineurina è una serin-treonin fosfatasi calcio-dipendente, composta da due subunità: 1) Calcineurina-A (Cn-A; 58-64 kDa), ad azione catalitica, contenente un sito di legame alla calmodulina; 2) Calcineurina-B (Cn-B; 19 kDa), subunità regolatrice, che lega quattro ioni calcio (uno con alta affinità e tre con bassa affinità).

Il legame del calcio al complesso calmodulina-calcineurina, stimola l'attività serin-treonin fosfatasica della calcineurina A che va a defosforilare il fattore nucleare NFAT (Nuclear Factor of Activated T cells), promuovendo la sua traslocazione nel nucleo. Una volta nel nucleo, NFAT si lega a specifiche sequenze di DNA, stimolando la trascrizione di mRNA e la sintesi di nuove proteine.

Dati sperimentali [120], ottenuti addizionando a cellule muscolari C2C12 in coltura dosi di IGF-1 (10 ng/ml) sufficienti ad indurre un aumento del diametro dei miotubi, hanno evidenziato: a) iperfosforilazione di NFAT (indice della probabile inibizione della calcineurina); b) attivazione della via di trasduzione del segnale PI3K-AKT-mTOR, anche in presenza di ciclosporina A (specifico inibitore della calcineurina) nel mezzo di coltura. Inoltre, è stato osservato che l'inattivazione farmacologica di PI3K con LY294002 [2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one] chiamato anche PI3K-Inhibitor determina una moderata atrofia dei miotubi, mentre l'attivazione IGF1-dipendente di PI3K comporta fosforilazione di AKT. Tali risultati suggeriscono che l'induzione dell'ipertrofia muscolare ad opera di IGF-1, possa aver luogo attraverso un meccanismo d'azione calcineurina-indipendente, che porta all'attivazione di mTOR attraverso la via PI3K-AKT. La chinasi AKT, infatti, mediante fosforilazione ed inattivazione dell'eterodimero amartina-tuberina o TSC1-TSC2 (tuberous sclerosis complex 1-tuberous sclerosis complex 2), promuoverebbe la diretta attivazione di mTOR ad opera della proteina GTPasica Rheb (Ras homolog enriched in brain) [139]. E' stato osservato, infatti, che la mancata funzionalità del complesso TSC e la sovraespressione di Rheb inducono, in cellule di mammifero, iperfosforilazione di p70S6k e 4EBP1 anche in assenza di fattori di crescita o in presenza di wortmannina [140].

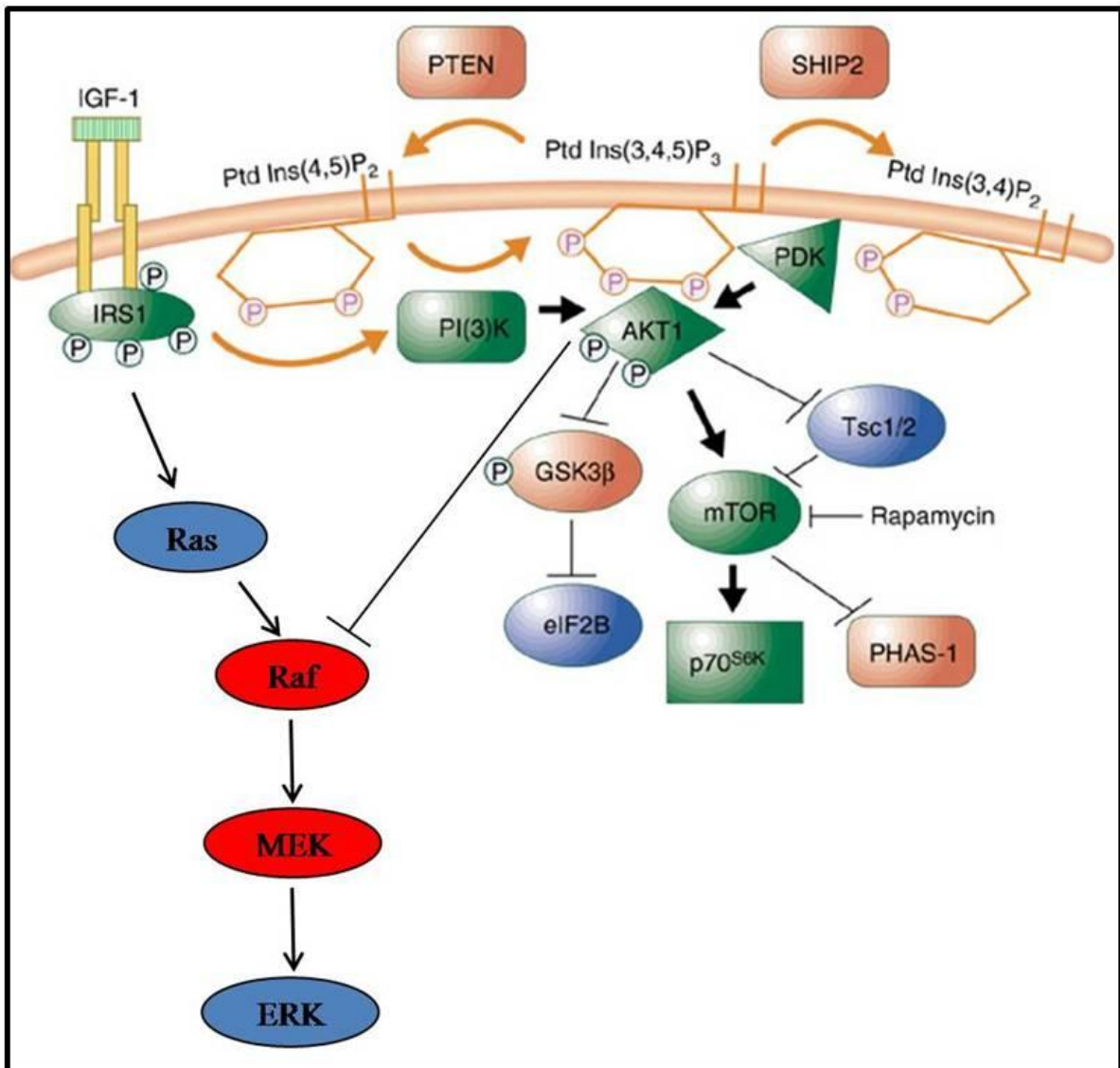


Figura 1.7 : *Rappresentazione delle vie di signaling cellulare alla base del processo di ipertrofia muscolare scheletrica [tratto da TRENDS in Molecular Medicine].*

5. IL METABOLISMO ENERGETICO CELLULARE: AMPK

La principale proteina ad essere studiata come sensore della regolazione del bilancio energetico cellulare è stata la proteina chinasi attivata da AMP (AMPK) [141] ed omologhi di AMPK sono stati identificati in una grande varietà di eucarioti, da quelli più primitivi fino a stadi evolutivi più avanzati, suggerendone la primitiva origine e conservazione evolutiva [141].

Durante gli ultimi anni, è stato evidenziato che AMPK è coinvolta anche nella regolazione del bilancio energetico di tutto l'organismo, rispondendo a segnali ormonali e di nutrienti nel sistema nervoso centrale e nei tessuti periferici che regolano la richiesta di cibo ed il dispendio energetico, *Figura 1.8* [142].

AMPK è considerata una proteina enzimatica dal ruolo chiave in condizioni di deficit energetico cellulare, è infatti in grado di inibire le vie metaboliche che portano al consumo di energia per favorire i pathways finalizzati alla produzione di energia [142].

5.1 STRUTTURA DI AMPK

La proteina chinasi attivata dall'AMP (AMPK), appartenente alla famiglia delle serina/treonina chinasi [143], è un complesso eterotrimerico formato da una subunità catalitica (AMPK- α) e due subunità regolatorie (AMPK- β e AMPK- λ). Nell'uomo, le subunità che costituiscono AMPK sono codificate da sette geni ($\alpha 1$, $\alpha 2$; $\beta 1$, $\beta 2$; $\lambda 1$, $\lambda 2$, $\lambda 3$) in grado di formare almeno 12 $\alpha \beta \lambda$ eterotrimeri, giustificando così la molteplicità dei ruoli funzionali di questa proteina [144].

5.2 ATTIVAZIONE DI AMPK

AMPK è attivata da una varietà di eventi cellulari in grado di aumentare la concentrazione di AMP e ridurre i livelli di ATP, come ad esempio nel corso di una contrazione muscolare, un esercizio muscolare intenso, in condizioni di ipossia, ischemia, stress ossidativo, intossicazione metabolica, carenza di nutrienti. In risposta all'alterazione nel bilancio energetico cellulare, l'attivazione di AMPK promuove modificazioni metaboliche atte a preservare l'omeostasi bioenergetica e la sopravvivenza cellulare [142,144].

AMPK è attivata allostericamente da 5'-AMP. Tuttavia, il complesso resta inattivo a meno che non venga fosforilato su un residuo di treonina, in posizione 172 (Thr-172), nel segmento di attivazione della subunità catalitica [145].

Esistono altri tre modi attraverso cui l'AMP, una volta legato, può attivare il sistema:

1) convertendo la AMPK in un miglior substrato per la chinasi a monte; 2) attivando direttamente quest'ultima; 3) convertendo la AMPK in un peggior substrato per la proteina fosfatasi, inattivatrice del complesso.

La chinasi necessaria alla fosforilazione di AMPK, chiamata inizialmente AMPK chinasi (AMPKK), è stata parzialmente purificata da epatociti di ratto. Ciò ha permesso di riconoscere che appartiene alla famiglia delle serina/treonina chinasi, e che era già stata scoperta come prodotto del gene mutato nella malattia autosomica recessiva umana di Peutz-Jeghers. Questa sindrome si caratterizza per la presenza di tumori benigni intestinali e per un'aumentata probabilità di sviluppare tumori maligni in altri luoghi. La chinasi attivatrice della AMPK, rinominata LKB1, è quindi un fattore soppressore di tumori [145].

Mediante molteplici meccanismi, l'attività di AMPK assicura una risposta estremamente sensibile ad ogni piccolo aumento di AMP al di fuori di un'appropriata concentrazione. Poiché l'effetto di attivazione è antagonizzato da alte concentrazioni di ATP, il sistema risponde non semplicemente ad un aumento dell'AMP ma all'aumento del rapporto AMP/ATP all'interno della cellula [146,147].

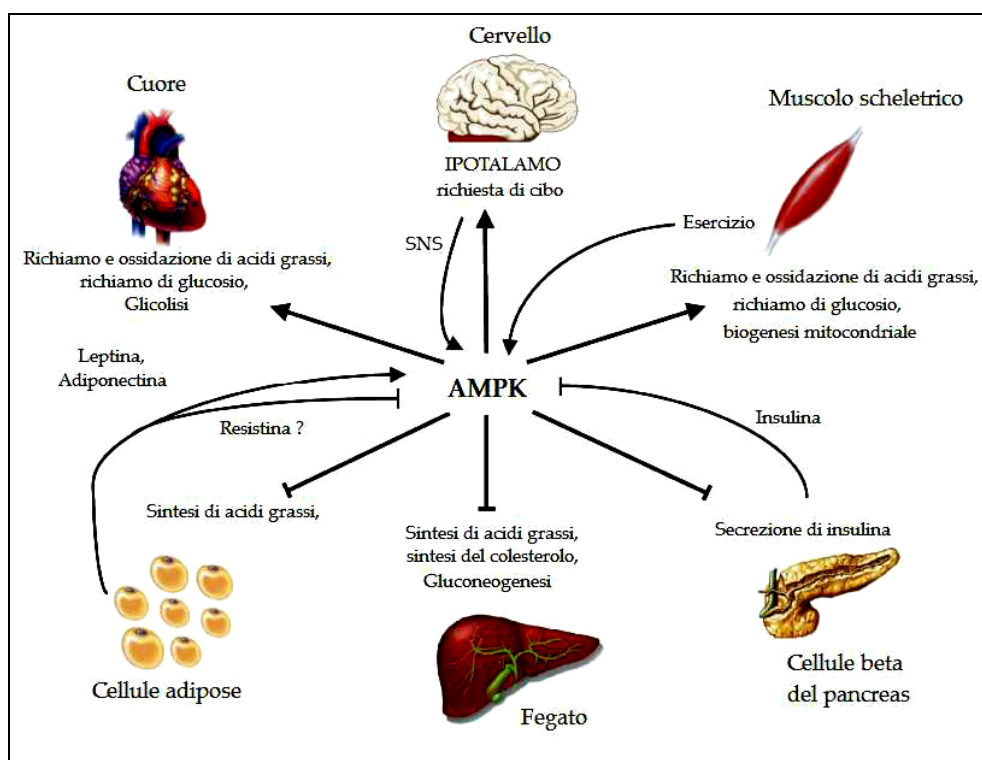


Figura 1.8 : Probabili ruoli dell'AMPK nel controllo del metabolismo energetico nell'intero organismo. [Tratto da Carling 2004; Kahn, Alquier et al. 2005].

5.3 RUOLO DI AMPK NELLA REGOLAZIONE DEL METABOLISMO AEROBICO, NELL'OSSIDAZIONE DEGLI ACIDI GRASSI E NELLA SINTESI DEL COLESTEROLO

AMPK rappresenta il principale regolatore cellulare del metabolismo anaerobico, promuovendo il trasporto di glucosio non insulino-dipendente e la successiva risposta metabolica nel muscolo scheletrico e nel cuore. L'attivazione di AMPK induce l'espressione e la traslocazione del trasportatore del glucosio GLUT-4 sulla membrana plasmatica, e il conseguente aumento nell'uptake del glucosio [141,142,144,147].

AMPK regola il processo glicolitico mediante la fosforilazione dell'enzima 6-fosfofrutto2-chinasi, enzima chiave per la sintesi del fruttosio 2,6-bifosfato, step limitante del processo. Inoltre, nella regolazione dei processi di glicolisi e di glicogeno lisi, AMPK è in grado di inibire l'espressione del trasportatore di creatina della membrana apicale (CRT) nelle cellule del tubulo prossimale renale. Questa inibizione è di estrema importanza in quanto, in condizioni di stress metabolico, è essenziale ridurre il riassorbimento non necessario di creatina e il dispendio energetico cellulare [148].

La proteina AMPK esercita inoltre un effetto modulatorio sul metabolismo degli acidi grassi e del colesterolo in siti specializzati quali in tessuto adiposo, il fegato e il tessuto muscolare. AMPK stimola l'uptake degli acidi grassi, inibisce la sintesi degli stessi e del colesterolo mediante fosforilazione diretta degli enzimi acetyl-CoA carbossilasi1, coenzima A riduttasi e la lipasi ormono-sensibile. In aggiunta a ciò, AMPK reprime l'espressione e l'attività di fattori di trascrizione come SREBP1c (sterol regulatory element-binding protein 1c) e ChREBP (carbohydrate response element binding protein) [149].

Da ultimo, l'attivazione di AMPK riduce la concentrazione di malonyl-CoA nel citoplasma e facilita l'accumulo e l'ossidazione degli acidi grassi nei mitocondri [149].

5.4 RUOLO DI AMPK NEL CONTROLLO DELLA MASSA MUSCOLARE SCHELETRICA

Il mantenimento della massa muscolare dipende dall'accurato bilancio tra processi catabolici ed anabolici del metabolismo cellulare, che determina i livelli di proteine muscolari ed un corretto sviluppo delle fibre muscolari.

Quando i livelli energetici cellulari sono bassi, la proteina AMPK promuove la sintesi di ATP, incrementando i processi catabolici e conservando l'ATP presente, riducendo drasticamente tutti i processi metabolici ATP-dipendenti, ovvero le vie di biosintesi cellulare [150].

Nel sistema muscolare, questo meccanismo di regolazione viene messo in atto quando AMPK è attivata da insufficienza energetica cellulare, e ha come conseguenza l'arresto dei processi di sintesi proteica e di crescita cellulare e la stimolazione delle vie di degradazione proteica [150].

Per questa ragione la proteina AMPK viene considerata come il principale sensore metabolico nelle cellule muscolari, in grado di modulare i processi di sintesi e degradazione proteica e quindi regolare la massa muscolare. AMPK inibisce la sintesi proteica cellulare mediante la repressione dell'attività della proteina mTOR1 (mammalian target of Rapamycin), e giocando un ruolo fondamentale nella regolazione dei meccanismi di degradazione proteica, stimolando i processi di ubiquitinazione ed i pathways di autofagia lisosomiale [151].

I fenomeni di stress finora descritti interferiscono con la produzione di ATP, ma uno stress metabolico che attiva AMPK in condizioni fisiologiche attraverso il consumo (e non la diminuzione di produzione) di ATP è la contrazione muscolare durante l'esercizio muscolare [152].

Il grado di attivazione di AMPK dipende dall'intensità dell'esercizio e da cambiamenti nei rapporti AMP/ATP e creatina/fosfocreatina [153].

L'attivazione di AMPK in risposta all'esercizio acuto inibisce le vie di consumo dell'ATP ed attiva il metabolismo dei carboidrati ed acidi grassi, per ripristinare i livelli di ATP nel muscolo. Inoltre, l'AMPK gioca anche un ruolo nella risposta adattativa del muscolo all'esercizio continuato, alterando le riserve energetiche e l'espressione di geni modulati dall'esercizio fisico [154,155].

I dati presenti in letteratura suggeriscono che la modulazione dell'attività di questo regolatore dell'omeostasi energetica cellulare potrà rappresentare un ottimo target nello studio di patologie a carico del sistema muscolare [154,155]. Per questa possibilità applicativa, appare sempre più rilevante conoscere i precisi meccanismi mediante i quali AMPK esercita le sue numerose azioni di controllo metabolico, con l'intento finale di migliorare le strategie terapeutiche nella cura di patologie a carico del muscolo scheletrico.

6. IL PARADOSSO FRANCESE

Studi epidemiologici hanno rivelato una correlazione inversa tra il consumo di vino rosso e l'incidenza di patologie cardiovascolari, un fenomeno conosciuto come "Paradosso francese".

Con questo termine, coniato nel 1992 da Serge Renaud, docente dell'Università di Bordeaux, è stata descritta in Francia una presunta minore incidenza di mortalità per malattie cardiovascolari, nonostante il relativamente alto consumo di alimenti ricchi in acidi grassi saturi, rispetto ad altri paesi dieteticamente comparabili [156].

Il "Paradosso Francese" descrive quindi come alcuni specifici alimenti, ricchi di antiossidanti, possano influenzare in maniera rilevante l'incidenza di alcuni tipi di malattie. Renaud ha successivamente evidenziato come il French Paradox fosse correlato al consumo di vino rosso, ampiamente presente nella dieta dei francesi, ma non di altre popolazioni europee. Il vino, infatti, ha un elevato contenuto di polifenoli, potenti antiossidanti [156].

La dieta mediterranea, ricca di frutta, verdura, cereali, pesce, olio di oliva e che prevede la regolare assunzione di moderate quantità di vino, è sempre stata considerata ottimale nel mantenimento di un buono stato di salute. Studi scientifici hanno dimostrato come in popolazioni che seguono la dieta mediterranea si abbia una riduzione della mortalità globale, con riduzioni del 9% della mortalità per patologie cardiovascolari, del 6% della mortalità per neoplasie e del 13% dell'incidenza di sindromi di Alzheimer e Parkinson rispetto alla media [157,158].

L'ultimo riconoscimento dell'importanza per la salute di questo tipo di alimentazione è stato dato dall'Organizzazione delle Nazioni Unite per l'Educazione, la Scienza e la Cultura (UNESCO) che, il 17 novembre 2010, ha iscritto la dieta mediterranea nelle liste del patrimonio culturale immateriale dell'umanità.

L'organismo combatte lo stress ossidativo utilizzando una serie di sistemi, enzimatici e non, che con la loro azione limitano il potenziale danno causato dalle specie reattive dell'ossigeno. Molti sistemi sono già presenti all'interno dell'organismo (antiossidanti endogeni); altri devono essere introdotti attraverso la dieta (antiossidanti esogeni).

Gli antiossidanti sono definiti in generale come "qualsiasi sostanza che, presente in bassa concentrazione rispetto ad un substrato ossidabile, è in grado di rallentare o inibire l'ossidazione di quel substrato"; in questo modo substrati ossidabili come lipidi, proteine e DNA vengono protetti dall'ossidazione e rimangono inalterati [159,160].

Gli antiossidanti possono essere classificati in base alla loro provenienza e alle caratteristiche strutturali: tra gli antiossidanti endogeni sono presenti sistemi enzimatici (superossido dismutasi,

catalasi e glutathione perossidasi) e sistemi non enzimatici (glutathione). Tra gli antiossidanti esogeni si trovano vitamine e composti non vitaminici, come carotenoidi e polifenoli [160].

Tra gli antiossidanti esogeni di natura non vitaminica i polifenoli rappresentano i composti più abbondanti nella nostra dieta e sono presenti in frutta, vegetali, cereali, olive, legumi secchi, cioccolato e bevande come tè, caffè e vino. Malgrado la loro ampia distribuzione, gli studi sugli effetti dei polifenoli sono cominciati solo negli ultimi anni [161,162].

6.1 IL RESVERATROLO

Il Resveratrolo è un composto chimico di formula $C_{14}H_{12}O_3$, peso molecolare 228.25 Da, derivato dello stilbene, dal quale differisce per la presenza di 3 gruppi ossidrilici legati ai 2 anelli benzenici (l'anello che contiene 2 ossidrilici ripete la struttura del resorcinolo), *Figura 1.9*.

Il resveratrolo esiste in due forme isomeriche cis- e trans-, ma la conformazione biologicamente attiva e più studiata sembra essere la forma trans-. Si forma a seguito di una reazione di condensazione tra tre molecole di malonil CoA e una molecola di cumaroil CoA catalizzata dall'enzima resveratrolo sintasi, che produce inoltre quattro molecole di CO_2

Si presenta come polvere biancastra [163,164].

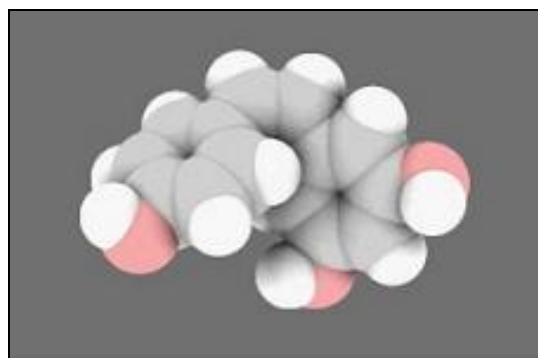
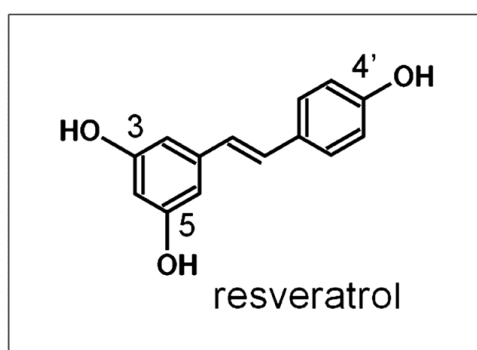


Figura 1.9 : *Formula chimica e struttura conformazionale del resveratrolo, isoforma trans-.*

È una fitoalessina prodotta da varie piante (è stato isolato per la prima volta da *Veratrum album*), tal quale o sotto forma di glicoside, in risposta ad un danno, ad un trauma di natura meccanica, alle radiazioni ultraviolette oppure a seguito di un'infezione provocata da microorganismi patogeni o all'attacco di alcuni funghi (per es., *Botrytis cinerea*).

Il resveratrolo è un composto che si trova naturalmente in molti prodotti alimentari di origine vegetale e in alcune piante [163,164].

E' presente nel vino, sia bianco che rosso, ma in concentrazioni differenti: in particolare è presente in gran quantità nella buccia delle uve rosse e nel vino da esse prodotto (generalmente da 0,5 a 5 mg/litro – *Figura 1.10*) [165].

Il resveratrolo si trova inoltre in diverse tipologie di frutta e altri vegetali come il mirtillo rosso, la pianta del gelso, la mora, le arachidi e le noccioline, l'elleboro bianco, il pino silvestre, l'eucalipto e l'abete rosso [163,164].

VINO	RSV TOTALE (mg/L)
Vino bianco	0,05-1,80
Vino rosato	0,43-3,52
Vino rosso	1,92-12,59
Succo d'uva rossa	1,14-8,69

Figura 1.10 : *Quantitativo di resveratrolo, espresso in mg/L, presente nelle diverse tipologie di vino.*

A livello commerciale, il resveratrolo è sintetizzato dalla specie vegetale *Polygonum cuspidatum*, una pianta erbacea perenne, appartenente alla stessa famiglia del grano saraceno (*Polygonaceae*), *Figura 1.11*. Di origine asiatica, questa specie cresce spontaneamente in zone aride degli Stati Uniti e nel sud del Canada, e viene coltivata principalmente in Cina e in Giappone (popolarmente nota come Ko-J-Kon); è una pianta nota sin dall'antichità, impiegata nella medicina popolare come erba lassativa e, occasionalmente, utilizzata come cibo, oggi molto importante nella fitoterapia moderna.



Figura 1.11 : *Specie vegetale Polygonum cuspidatum.*

Ad oggi questa pianta ha assunto un'importanza rilevante proprio per l'elevata concentrazione di resveratrolo nelle sue radici, rappresenta infatti la fonte elettiva arrivando a contenere quantità anche 400 volte superiori a quelle contenute nell'uva rossa.

Anche se queste piante ed estratti vegetali sono stati utilizzati per vari scopi terapeutici da culture antiche, il resveratrolo è stato descritto per la prima volta nel 1940 come un componente fenolico dell'erba medicinale Elleboro (*Veratrum grandiflorum*) [166,167].

Questo polifenolo non ricevette in passato molta attenzione, fino alla scoperta della sua proprietà di inibire la capacità proliferativa in cellule tumorali [166,167].

Essendo un composto fenolico, il resveratrolo è in grado di attraversare la membrana plasmatica ed essere ben assorbito per via orale. Dopo essere stato metabolizzato, questo polifenolo può interagire e modulare gli enzimi di fase I e di fase II [168].

Dagli studi di farmacocinetica in vivo è nota la rapida metabolizzazione del resveratrolo, che presenta un'emivita di 8-14 minuti una volta assorbito all'interno dell'organismo e una bassa biodisponibilità [166].

Gli studi in vitro a seguito di somministrazione orale di resveratrolo hanno dimostrato la presenza nel plasma della forma nativa e di quella coniugata del composto polifenolico, che viene rapidamente assorbito a livello del colon [169,170].

Nei mammiferi, il resveratrolo viene assorbito da diversi tessuti (fegato, reni e cuore) e la sua presenza nel plasma è dipendente dal tempo e dalla concentrazione della somministrazione [171,172].

La versatilità di questo composto fenolico va ricercata certamente nella moltitudine di targets di membrana ed intracellulari con i quali è in grado di interagire: recettori intracellulari, molecole segnale, enzimi di biogenesi, sistemi ossidativi, meccanismi di riparazione del DNA e fattori di trascrizione. Queste numerose interazioni sono alla base infatti degli effetti indotti dal resveratrolo nella cellula: la regolazione della proliferazione e dell'arresto del ciclo cellulare, il differenziamento e la morte cellulare, *Figura 1.12* [163].

Il resveratrolo appartiene alla classe di estrogeni di tipo I ed è in grado di legare il recettore per gli estrogeni (ERs) sulla membrana cellulare con una minore affinità rispetto all'estradiolo. Comportandosi da "estrogeno mimetico", il resveratrolo può attivare e modulare la via di signaling intracellulare degli estrogeni, attivando pathways metabolici direttamente connessi con le vie di signaling insulinico [173].

Il resveratrolo possiede la capacità di attivare o reprimere un vasto numero di vie di trasduzione del segnale intracellulari tra cui la via di signaling intracellulare degli estrogeni, le vie attivate dai fattori di crescita (IGF e segnale insulinico), le vie di trasduzione del segnale cAMP/cGMP-dipendenti, i pathways regolati da PI3K/AKT, le vie metaboliche controllate dalle MAP kinasi, le vie di signaling connesse a Jak/STAT e le cascate di trasduzione del segnale a seguito della regolazione dei canali ionici, *Figura 1.13* [163].

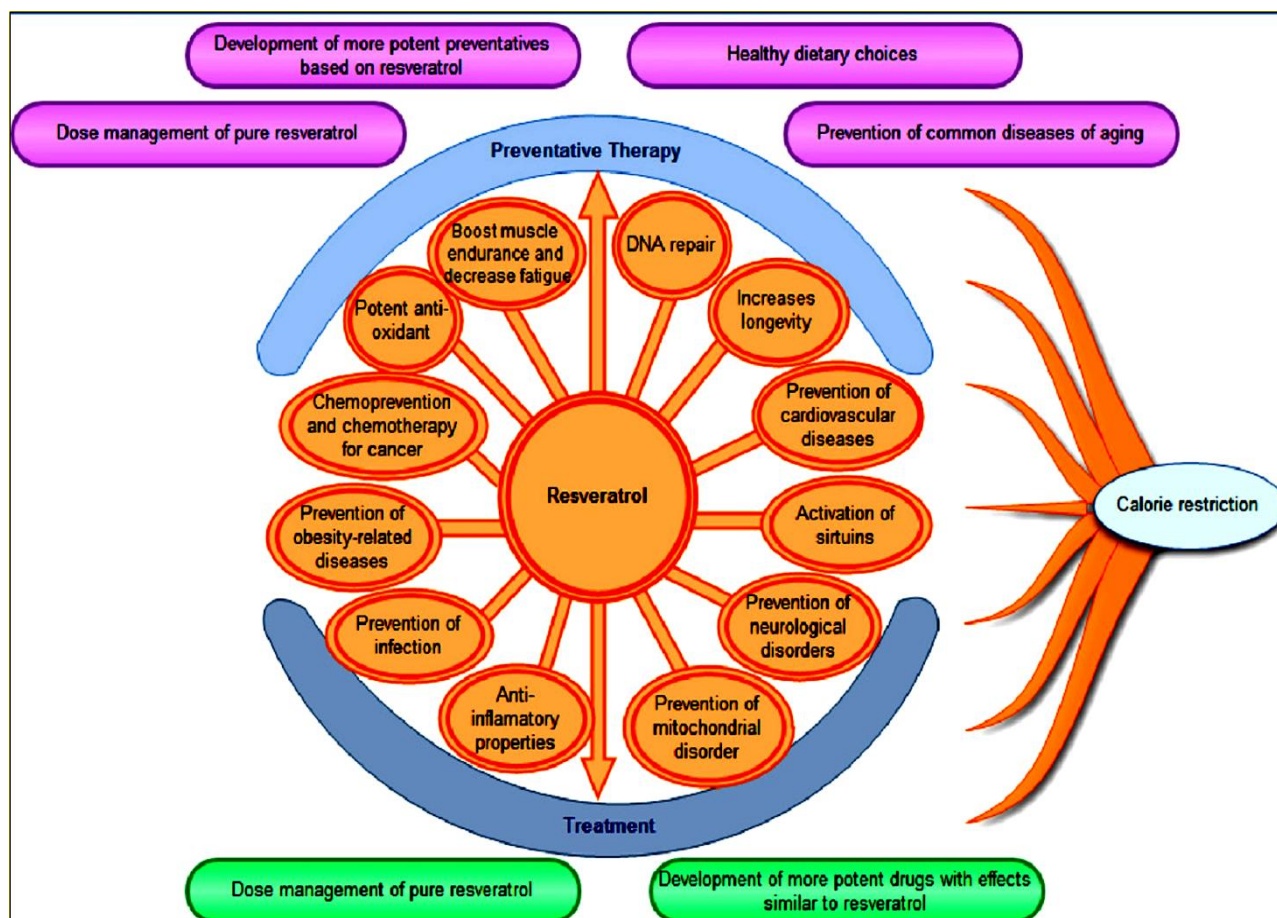


Figura 1.12 : *Rappresentazione delle molteplici azioni benefiche del resveratrolo.* [Tratto da Shazib Pervaiz, Andrea Lisa Holme. "Resveratrol: its biologic targets and functional activity". 2009. *Comprehensive Invited Review ANTIOXIDANT & REDOX SIGNALING*. Volume 11, Number 11].

6.1.1 IL RESVERATROLO E LA LONGEVITA'

La prima rivoluzionaria scoperta sul possibile ruolo del resveratrolo nell'attivazione dei geni antiaging per eccellenza, Sirtuine SIRT1, ha aperto la strada ad innumerevoli studi di ricerca volti a chiarificare i meccanismi alla base di questa potenziale azione antinvecchiamento [174].

Studi di questi ultimi anni, hanno descritto la capacità di questo polifenolo di attivare non solo SIRT1, ma anche altre Sirtuine come SIRT3 e SIRT4, e altri fattori associati con i fenomeni antiaging (FoxOs e il fattore PBEF) [174,175].

Queste evidenze, seguite e supportate da ulteriori prove sul controllo della restrizione calorica, hanno eletto il resveratrolo a “molecola della giovinezza” e hanno portato alla nascita di nuovi progetti scientifici atti allo studio degli effetti del polifenolo in patologie legate all'invecchiamento cellulare [176].

6.1.2 IL RESVERATROLO NEL SISTEMA CARDIOVASCOLARE

Dall'ipotesi del “French Paradox”, numerosi lavori in letteratura hanno descritto la pletora di azioni protettive esercitate dal resveratrolo in veste di agente cardioprotettivo [167,177]. Ciò rende questo composto naturale un interessante oggetto di studio se si considera che le patologie a carico del sistema cardiovascolare rappresentano, ad oggi, le principali cause di mortalità nel mondo.

I suoi effetti benefici si realizzano nell'inibizione dell'aggregazione piastrinica, la repressione della sintesi dei prostanoidi e la regolazione del metabolismo delle lipoproteine [163,164].

Un meccanismo aggiuntivo mediante il quale il resveratrolo può esercitare i suoi effetti benefici riguarda l'azione positiva sul sistema vascolare attraverso l'inibizione dell'espressione, della sintesi e della secrezione del vasosoppressore ET-1 nelle cellule endoteliali [178].

Numerosi lavori presenti in letteratura descrivono il ruolo di questo polifenolo naturale nella vasodilatazione, mediante la modulazione del rilascio di ossido nitrico [179], l'attivazione delle vie di signaling delle MAPK [180], il traffico intracellulare di Calcio e Potassio [181,182], l'interazione con recettori di membrana e canali ionici [163].

Evidenze presenti in letteratura documentano un ulteriore effetto protettivo del resveratrolo nella soppressione dei meccanismi di angiogenesi e, di conseguenza, della crescita tumorale [183].

Ampiamente documentata la peculiare azione di agente antifibrotico nelle cellule miocardiche attraverso la riduzione della proliferazione e del differenziamento dei fibroblasti cardiaci [184].

Sempre a livello delle cellule miocardiche, sono stati studiati potenziali effetti del polifenolo nella protezione contro i fenomeni ischemici, mediante il controllo delle correnti di Calcio [185].

6.1.3 IL RESVERATROLO COME AGENTE ANTIOSSIDANTE

Lo stress ossidativo contribuisce al verificarsi di disfunzioni a carico dell'endotelio e allo sviluppo di aterosclerosi [186]. La peculiare azione del resveratrolo sulla citotossicità indotta dai composti ossidrilici e sulla riduzione dell'accumulo delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) rende questa molecola un importante antiossidante naturale [187,188].

Le lipoproteine a bassa densità (LDL) esercitano un ruolo sostanziale nella formazione delle placche aterosclerotiche e nella risposta infiammatoria endoteliale [189].

La loro ossidazione rappresenta la principale causa di danno endoteliale e induce l'espressione di molecole pro-infiammatorie nelle cellule endoteliali.

Come noto, alti livelli di LDL nel sangue sono associati con un aumentato rischio di insorgenza di aterosclerosi; quindi, il controllo dei livelli di lipoproteine a bassa densità è fondamentale nel trattamento della risposta infiammatoria. Recenti lavori hanno dimostrato le proprietà protettive del resveratrolo nel contrastare la degradazione perossidativa dei lipidi [190] e nel controllo dell'uptake delle LDL ossidate nelle pareti dei vasi sanguigni [191].

Studi molto recenti hanno evidenziato che l'assunzione nella dieta di resveratrolo potrebbe ridurre il danno ossidativo e la correlata disfunzione mitocondriale indotti dall'età e dall'esercizio fisico [192].

Differenti meccanismi sono stati proposti nel tentativo di spiegare l'attività antiossidante del resveratrolo, agendo come protettore cellulare nei confronti dei fenomeni di perossidazione lipidica e nell'eliminazione dei radicali liberi (azione "Scavenger") [164,188].

Importante è inoltre la sua capacità di attivazione della classe di Sirtuine delle istone deacetilasi NAD⁺-dipendenti [176,181].

Le Sirtuine regolano un notevole numero di pathways cellulari attraverso l'attivazione di fattori di trascrizione e di enzimi coinvolti nel metabolismo cellulare [193].

6.1.4 IL RESVERATROLO E L'INFIAMMAZIONE

L'aterosclerosi è una patologia cronica di natura immuno-infiammatoria. Le citochine pro-infiammatorie, quali il fattore di necrosi tumorale (TNF- α), le interleuchine IL-6, IL-8, IL-13 e ulteriori importanti mediatori della risposta infiammatoria come istamina, serotonina, leucotriene, prostaglandine sono direttamente coinvolti nella genesi di aterosclerosi [194].

Sono presenti in letteratura diverse evidenze che descrivono l'azione anti-infiammatoria del polifenolo resveratrolo, tra cui l'inibizione della sintesi di TNF- α e IL-6 [195], l'inattivazione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) in neutrofili, monociti e macrofagi, l'inibizione del rilascio di citochine da macrofagi e linfociti [163,166].

6.1.5 IL RESVERATROLO NELL'OSTEOPOROSI E NEL DIABETE

Questo polifenolo naturale è stato investito di notevole interesse a causa dei suoi potenziali effetti benefici in patologie osteoarticolari e nelle malattie metaboliche, quali il diabete [196,197]. Il trattamento con resveratrolo ha infatti mostrato un effetto protettivo sul tessuto osseo mediante il controllo dell'induzione di proteine morfogenetiche specifiche per questo tessuto [198].

Ulteriori meccanismi di protezione del tessuto osseo, osservati a seguito di somministrazione di questa fitoalessina, sono rappresentati dalla stimolazione della proliferazione cellulare e il differenziamento degli osteoblasti ad opera del resveratrolo. Inoltre, questo polifenolo promuove attivamente il differenziamento in vitro delle cellule staminali mesenchimali in osteoblasti, sfavorendo la formazione di adipociti a seguito di inibizione della via di signalling PPAR γ 2 [199].

Il resveratrolo è in grado di modulare l'uptake di glucosio, un processo fondamentale nella patologia diabetica [200,201].

E' inoltre un inibitore della secrezione insulinica mediante diversi meccanismi che sono stati studiati ampiamente in letteratura in questi ultimi anni:

- Regola negativamente il pathway di secrezione insulinica.
- Esercita un effetto insulino-soppressore indipendentemente dalla sua attività estrogenica intrinseca.
- Regola il metabolismo del glucosio e l'ossidazione mitocondriale [200,201].

6.1.6 IL RESVERATROLO NEL SISTEMA MUSCOLARE

Il potenziale ruolo del resveratrolo nel sistema muscolare rimane ad oggi ancora poco studiato ed in letteratura sono presenti pochi e frammentari lavori di ricerca volti ad ipotizzare un possibile impiego di questo polifenolo nella terapia di patologie a carico del sistema muscolare.

Gli studi fino ad oggi documentati hanno descritto l'azione di questo polifenolo sui meccanismi di uptake di glucosio nel muscolo scheletrico mediante la regolazione dell'attività del principale sensore metabolico cellulare AMPK [202], la sua azione sull'ossidazione degli acidi grassi e in altri processi metabolici del tessuto muscolare quali l'inibizione del catabolismo proteico [203].

Altri lavori espongono l'azione del resveratrolo sui pathways cellulari regolati dal segnale insulinico (PI3K/AKT), sul trasporto del glucosio intracellulare, attraverso il trasportatore del glucosio GLUT4 [204,205].

Come già descritto nei paragrafi precedenti, gli effetti benefici del resveratrolo come agente antiossidante ed antinfiammatorio ricoprono un'importanza fondamentale anche nel sistema muscolare: nella protezione verso lo stress ossidativo cellulare mediato dai ROS, dalla morte cellulare o da fenomeni di danno muscolare, nella prevenzione dei fenomeni ischemici [206].

Non meno importanti, infine, gli effetti studiati in modelli murini allo scopo di confermare la potenziale azione del resveratrolo nell'aumento della forza muscolare e della resistenza a sforzi e lavori muscolari prolungati nel tempo [203,207].

2. SCOPO DELLA TESI

La Nutrigenomica si avvale dell'uso di strumenti di genomica funzionale al fine di studiare i sistemi biologici e comprendere in quali modi i nutrienti assunti con la dieta possono interagire con le vie metaboliche cellulari e controllare così lo stato di omeostasi [2,3,6].

La ricerca in campo nutrigenomico consente di sviluppare regimi alimentari personalizzati in un determinato range di nutrienti e sulla base della conoscenza specifica del patrimonio genetico individuale, mediante l'impiego di tecniche di indagine a livello di trascrizione genica, sintesi proteica e metabolismo cellulare [9,10].

Studi epidemiologici hanno evidenziato la stretta associazione tra l'assunzione di determinati nutrienti e l'insorgenza ed il grado di severità di patologie croniche [1,13,21].

Notevole attenzione ha ricevuto nel corso degli ultimi anni lo studio delle proprietà benefiche dei polifenoli e, tra questi, il Resveratrolo. A seguito dell'osservazione di una possibile correlazione inversa tra il consumo di vino rosso e l'incidenza di patologie cardiovascolari in Francia, fenomeno poi descritto con il termine di "Paradosso francese" nel 1992 da Serge Renaud [156], questa fitoalessina è stata oggetto di molteplici ricerche in campo medico e biologico.

Ad oggi in letteratura sono descritti numerosi e diversi effetti biologici del resveratrolo, in quanto molteplici sono le sue molecole bersaglio intracellulari [163]. Questo polifenolo è in grado di interagire con numerose molecole di attivazione di vie di signaling intracellulare e su specifici geni regolatori del ciclo cellulare, controlla positivamente l'attività di numerosi fattori di trascrizione, inibisce l'attività di specifiche proteine chinasi, down-regola l'espressione di geni proapoptotici, è coinvolto nella regolazione dei meccanismi di angiogenesi e di infiammazione, induce la sintesi di enzimi antiossidanti, regola l'espressione di enzimi chiave nel metabolismo cellulare quali il citocromo P450s, direttamente coinvolto nel metabolismo dei farmaci [164,165,166,167,176].

L'importante regolazione delle vie metaboliche sopra citate ha guidato lo studio degli effetti benefici di questo polifenolo come agente cardioprotettivo, nella repressione della risposta infiammatoria, o ancora come vasodilatatore, nell'inibizione dell'ossidazione di lipoproteine a bassa densità, nella soppressione dell'aggregazione piastrinica e, non meno importanti, sono state dimostrate le sue proprietà anti-aterosclerotiche [177,179,185,188,189]. Nascendo come forte antiossidante, questa molecola regola l'attivazione delle Sirtuine ed è quindi coinvolto nei processi di senescenza cellulare [175,176]. La sua attività è stata studiata anche nella prevenzione delle infezioni, nella prevenzione dei disordini mitocondriali e di disordini neurologici, nei processi di riparazione del DNA, nella tumorigenesi, nella prevenzione delle patologie correlate alla Sindrome Metabolica [163,164, 174, 181, 183, 196,197].

Minore attenzione è stata riservata però allo studio dei possibili effetti benefici di questo polifenolo naturale sul sistema muscolare. Sono presenti in letteratura alcuni lavori che descrivono i meccanismi di regolazione che il resveratrolo sembra esercitare sul metabolismo cellulare nel muscolo, nella risposta alla fatica e nell'incremento della forza muscolare, come pure iniziali studi del suo ruolo nel processo di miogenesi [202,203,205,207].

Assume quindi una rilevanza interessante l'indagine delle possibili attività biologiche di sostanze di origine naturale come il resveratrolo in processi fisiologici quali il differenziamento muscolare, allo scopo di ricercare un potenziale impiego di questi composti nei processi di riparazione del danno muscolare e in patologie croniche a carica del sistema muscolare.

Il processo di differenziamento muscolare scheletrico comprende diversi step strettamente regolati e coordinati.

La sequenza di eventi che porta al differenziamento a miotubi inizia con l'arresto del ciclo cellulare, fase caratterizzata dall'espressione del fattore di trascrizione miogenina e dell'inibitore delle chinasi ciclina-dipendenti (cdk) p21; successivamente si ha il differenziamento fenotipico a miociti con l'espressione delle proteine sarcomeriche, in particolare la miosina, marker di differenziamento terminale. Infine le cellule fondono in miotubi multinucleati [65,66,67].

Partendo da questi presupposti, si è voluto analizzare il possibile ruolo svolto dal resveratrolo sul controllo della progressione del ciclo cellulare e sull'induzione del processo di differenziamento muscolare. Sono quindi state oggetto di indagine successiva le diverse fasi del differenziamento, il suo completamento e la genesi di ipertrofia nelle cellule muscolari.

Il modello cellulare scelto per gli esperimenti in vitro è la linea di mioblasti murini immortalizzati C2C12, che rappresenta un ottimo prototipo per lo studio del processo di differenziamento e di fusione cellulare [208,209].

Lo studio degli effetti del resveratrolo nella fase proliferativa, nel differenziamento e nello sviluppo di ipertrofia post-differenziativa è stato condotto su più livelli di indagine: la valutazione dell'espressione genica ha rappresentato un indicativo punto di partenza, cui ha seguito la determinazione quantitativa dei livelli di espressione proteica ottenuti mediante analisi di western blot. L'espressione proteica qualitativa e gli studi dei cambiamenti morfologici sono stati condotti mediante saggi di immunofluorescenza indiretta.

3. MATERIALI E METODI

MATERIALI

Il modello prescelto per la sperimentazione in vitro, rappresentato dalla linea cellulare di mioblasti murini immortalizzati C2C12, è stato fornito dall'European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC).

Tutti i reagenti utilizzati sono stati acquistati dalla ditta Sigma Chem. (St. Louis, MO, U.S.A.).

Sono di seguito elencati tutti gli anticorpi primari, monoclonali o policlonali, gli anticorpi secondari coniugati con perossidasi o rodamina, usati nei saggi di western blot ed immunofluorescenza indiretta, prodotti dalla ditta Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, U.S.A.):

anti-MyoD (C-20), anti-Myf-5 (C-20), anti-Myf-6 (C-19), anti-Actina (I-19), anti- α -Tubulina (TU-02), anti-Akt1 (C-20), anti-MyHC (H-300), anti-p21 (C-19), anti-Miogenina (D-10), anti-Calnexina (H-70), anti-GDF-8 (N-19), anti-IGF1 receptor- β (C-20), anti-N-Caderina (H-63), anti-p120 (H-90), anti-AMPK α 1/2 (H-300); anti-c-Jun (H-79); anti-pERK (E-4); anti-p38alfa (C-20); anti-p27 (C-19).

L'anticorpo primario anti α -Actinina Sarcomerica (A7811) è stato fornito dalla ditta Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO, U.S.A.).

3.1 COLTURE CELLULARI

Le cellule C2C12 possono essere mantenute nel loro stato proliferativo, non differenziato, se coltivate in terreno contenente alte concentrazioni di nutrienti (terreno di crescita: GM). Nei mioblasti proliferanti il fattore di regolazione miogenica MyoD è espresso, ma la sua funzione transattivante è controllata negativamente dai fattori di crescita presenti nel siero.

Per indurre il differenziamento terminale, i mioblasti vengono trasferiti in terreno contenente basse concentrazioni di nutrienti (terreno di differenziamento: DM). In queste condizioni di coltura l'attività di MyoD viene depressa ed i mioblasti escono dal ciclo cellulare, si orientano e acquisiscono il fenotipo miogenico di miociti mononucleati. In seguito i miociti fondono e danno origine a miotubi multinucleati.

Contemporaneamente agli evidenti cambiamenti morfologici, viene indotta l'espressione di geni specifici del differenziamento terminale. La transizione dal mioblasto precursore a fibra muscolare multinucleata è, infatti, finemente regolata a livello genico e di sintesi proteica. In particolare si osserva: un aumento della sintesi delle proteine miofibrillari (come l'actina muscolare scheletrica, le catene pesanti e leggere della miosina, le isoforme muscolari della tropomiosina e della troponina), un incremento dell'attività enzimatica intracellulare (isoforma muscolare della creatina fosfochinasi, glicogeno fosforilasi), la sintesi de novo di acetilcolinesterasi e del recettore per l'acetilcolina.

Lo stadio finale della miogenesi è la maturazione della fibra muscolare: nei miotubi contenenti centinaia di nuclei compaiono striature trasversali dovute all'assemblaggio delle miofibrille e della formazione dei sarcomeri; dopo pochi giorni di coltura in condizioni di differenziamento, i miotubi diventano eccitabili ed acquisiscono la capacità di contrarsi spontaneamente.

Tale tipo di differenziamento è irreversibile, infatti i miotubi differenziati non possono essere indotti a rientrare nel ciclo cellulare e a proliferare anche se esposti ad elevate concentrazioni di fattori di crescita.

3.1.1 CONDIZIONI DI COLTURA

Le C2C12 in proliferazione sono state mantenute in terreno GM così composto: DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium) ad alta concentrazione di glucosio (4.5 g/l), contenente sodio piruvato 1mM, penicillina 100 U/ml, streptomicina a 100 µg/ml, glutammina 4mM e 20% (v/v) di siero fetale bovino (FBS).

Le cellule in coltura vengono mantenute in un incubatore termostato a 37° C, 80% di umidità ed una concentrazione di CO₂ pari al 5%.

3.1.2 SUBCULTURA DI CELLULE C2C12

Le cellule C2C12, una volta raggiunto un grado di confluenza uguale o superiore al 70%, vanno incontro ad un processo di differenziamento spontaneo, è necessario quindi dividerle prima che la loro densità superi tale soglia. Infatti se il processo differenziativo è già in atto, la subcoltivazione porta a selezionare cloni incapaci di differenziare.

Per dividere le cellule è stato aspirato il terreno di coltura ed è stato effettuato un lavaggio con PBS (KCl 2.7 mM, KH₂PO₄ 1.5 mM, NaCl 137 mM, Na₂HPO₄ 8.1 mM pH 7.4). Quindi le cellule sono state staccate dal supporto con una soluzione di tripsina (0.05 % w/v) ed EDTA (0.02 % w/v).

Dopo aver controllato il distacco delle cellule al microscopio ottico, l'azione della tripsina è stata bloccata con terreno contenente FBS al 20% (v/v).

Le C2C12 sono state risospese in un opportuno volume di terreno di coltura e contate con emocitometro prima di essere trasferite in piastra alla diluizione di interesse.

Ogni giorno è stata valutata al microscopio ottico la morfologia delle cellule (sintomatica dello stato di salute) e la loro densità. Il medium di coltura è stato cambiato ogni giorno.

3.1.3 DIFFERENZIAMENTO MUSCOLARE SCHELETRICO

Per indurre il differenziamento, le cellule che hanno raggiunto almeno il 70% di confluenza sono state coltivate con il medium di differenziamento DM composto da DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium) ad alta concentrazione di glucosio (4.5 g/l), contenente: sodio piruvato 1mM, penicillina 100 U/ml, streptomicina a 100 µg/ml, glutammina 4mM e siero di cavallo (HS) al 1% (v/v).

Il terreno è stato cambiato ogni giorno. L'intero processo differenziativo si completa in 72-96 ore, durante questo periodo la morfologia cellulare viene osservata al microscopio ottico giornalmente.

3.1.4 CONGELAMENTO E SCONGELAMENTO DELLE CELLULE

Il congelamento in azoto liquido consente di conservare le cellule inalterate per lunghi periodi di tempo.

I criteri per una buona conservazione sono i seguenti: la sospensione cellulare deve essere in fase esponenziale di crescita; la velocità ottimale di congelamento deve essere di 1° C al minuto; il terreno di congelamento deve contenere un agente crioprotettivo, come il DMSO.

Per le C2C12 il medium di congelamento è costituito da FBS 90% (v/v) e DMSO 10% (v/v).

Le cellule quindi vengono conservate in azoto liquido a -196° C.

Lo scongelamento deve essere rapido per evitare che il DMSO possa danneggiare le cellule. Le provette contenenti le cellule sono state scongelate in un bagnetto a 37° C, la sospensione cellulare è stata diluita con medium fresco e quindi piastrata in flask.

Il giorno successivo è stato cambiato il medium.

3.1.5 SCHEMA DEI TRATTAMENTI CON RESVERATROLO

Di seguito sono riportati gli schemi di trattamento condotti sulle cellule C2C12 nella realizzazione della curva di crescita, nella studio della fase proliferativa, nell'induzione e progressione del processo differenziativo, nella fase di differenziamento terminale e di post-differenziamento, *Figura 3.1*.

Il medium di coltura implementato con resveratrolo è stato cambiato ogni 8 ore, sulla base delle indicazioni di emivita in vitro di questo composto, come riportato in diversi lavori sperimentali [210].

Terreno di controllo della proliferazione: terreno di crescita (GM).

Terreno di controllo del differenziamento: terreno di differenziamento (DM).

Mediante un'attenta ricerca in letteratura, sono state scelte differenti dosi di resveratrolo per i trattamenti cellulari: 0,1 μM , 10 μM e 25 μM .

Le concentrazioni scelte dovevano soddisfare due fondamentali criteri: la capacità di indurre effetti sul processo di differenziamento e la totale assenza di effetti citotossici.

Oltre alle referenze dei lavori in letteratura [202,210], sono stati eseguiti degli esperimenti preliminari di dose/risposta, al fine di individuare le dosi efficaci, secondo i criteri prima citati.

Come verrà mostrato nella sezione Risultati, le prove di dose/risposta hanno portato alla scelta finale delle due concentrazioni 0,1 μM e 25 μM di resveratrolo per i trattamenti sulle cellule.

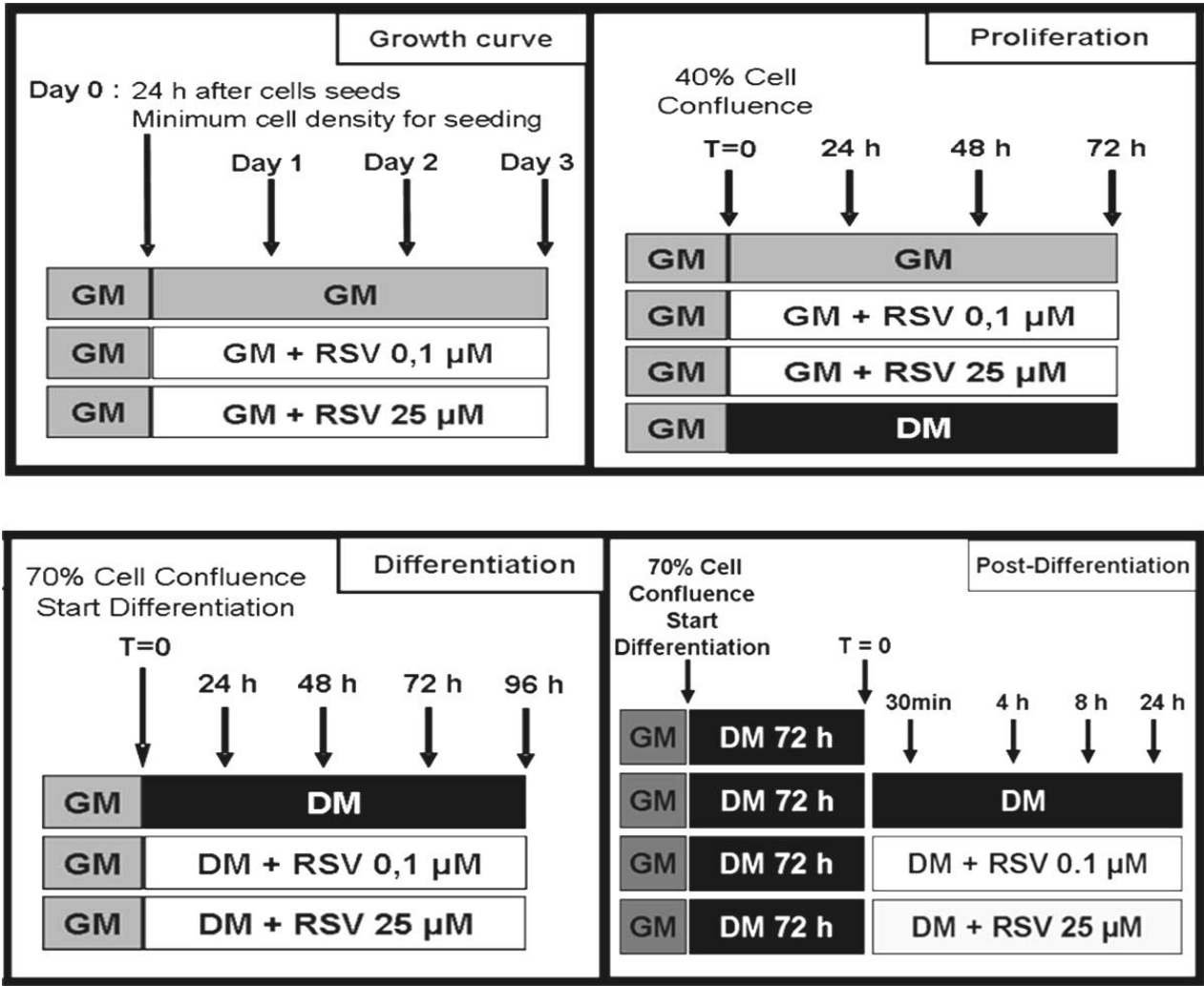


Figura 3.1 : Schema dei trattamenti con le due dosi di resveratrolo nelle diverse fasi studiate. Per ognuna delle fasi analizzate, sono indicati i tempi di inizio e fine dei trattamenti e la densità cellulare.

3.2 VALUTAZIONE DELLA PROLIFERAZIONE CELLULARE

3.2.1 CONTEGGIO VITALE CON TRYPAN BLUE E CURVA DI CRESCITA

Allo scopo di ottenere una curva di crescita cellulare, è stato valutato il numero di cellule per piastra attraverso un conteggio in presenza di una colorazione vitale con il colorante Trypan Blue.

I mioblasti proliferanti sono stati seminati in piastre di petri della dimensione 60mm x 15mm ad una confluenza del 40%. Le C2C12 sono state mantenute in terreno di crescita GM, cellule controllo, o trattate con terreno GM implementato con resveratrolo (nelle due concentrazioni di 0,1 e 25 μ M).

L'esperimento è stato condotto fino al raggiungimento da parte delle cellule di controllo dello stato di sub-confluenza, una densità cellulare che nelle C2C12 si può raggiungere tra il terzo ed il quarto giorno della curva di crescita. Il medium di coltura è stato cambiato ogni giorno.

Le cellule sono state staccate con tripsina-EDTA, risospese in DMEM +FBS 20% e centrifugate per 10 minuti a 163xg a temperatura ambiente. E' stato poi aspirato il surnatante ed il pellet cellulare è stato risospeso in PBS. E' stato utilizzato il PBS e non il normale medium di crescita per risospesare le cellule, poiché il Trypan Blue si lega alle proteine del siero, generando un fondo blu e rendendo più difficoltosa la conta delle cellule.

Il Trypan Blue è un colorante tossico e potenzialmente cancerogeno, per la colorazione si utilizza in soluzione allo 0.4% (w/v). La colorazione viene detta "vitale" perché il Trypan Blue non viene assunto dalle cellule vive, mentre penetra per diffusione attraverso la membrana cellulare delle cellule morte che così assumono una caratteristica colorazione blu.

In condizioni di sterilità sono stati prelevati 100 μ l della sospensione cellulare e ad essa è stato unito un volume uguale di colorante (diluizione 1:2).

Le cellule totali e le cellule morte sono state contate mediante emocitometro al microscopio ottico. Le cellule vive si presentano tondeggianti e translucide, quelle morte, avendo incorporato il colorante, assumono una colorazione blu.

Viene quindi calcolato il numero totale di cellule per ogni piastra e determinata la percentuale di vitalità: $(\text{Numero di cellule vive} \times 100) / \text{numero totale di cellule}$.

Unitamente ai conteggi di crescita cellulare, ogni giorno è stata monitorata la morfologia cellulare e i possibili cambiamenti dimensionali delle cellule trattate rispetto alle cellule controllo.

3.3 ANALISI DELL'ESPRESSIONE GENICA

3.3.1 REAL TIME PCR

La REAL TIME PCR consente la determinazione quantitativa del contenuto di una sequenza di DNA nel campione di interesse. Questa metodica rappresenta una delle innumerevoli applicazioni della PCR nella biologia molecolare.

Si basa sulla misura della fluorescenza emessa da molecole che interagiscono con il DNA e che differiscono per diverse caratteristiche, tra cui la modalità di emissione della fluorescenza, il tipo di legame al DNA e l'essere o meno sequenza-specifiche.

Il metodo sequenza-specifico utilizza una sonda complementare ad un breve tratto di DNA, in grado di emettere fluorescenza nel momento in cui si appaia ad un'elica di DNA (Taqman Probe).

Il metodo non sequenza-specifico, spesso più sensibile, si avvale dell'uso di un reagente chiamato Syber Green, che emette fluorescenza quando è legato al DNA non denaturato. Col procedere della reazione, si verifica un aumento della fluorescenza, dovuto all'accumulo dei prodotti di PCR.

Il ciclo che coincide con il primo incremento significativo della fluorescenza è detto "ciclo soglia" (threshold cycle, Ct); esso rappresenta l'inizio della fase esponenziale della PCR.

Maggiore è la quantità iniziale di template, ovvero di DNA, prima verrà raggiunto il ciclo soglia. Il valore del Ct è, quindi, utilizzato per ricavare il numero di copie di template, essendo inversamente correlato ad esso.

3.3.2 RT-PCR ARRAY

Le piastre array permettono l'analisi contemporanea dei livelli di espressione di numerosi geni.

In questo lavoro, le piastre utilizzate per l'analisi in Real-Time PCR sono state prodotte dalla ditta SABiosciences (SABiosciences Corporation, Frederick, MD 21703 USA).

Per lo studio dell'espressione genica durante la fase proliferativa (24 ore) è stata utilizzata una piastra array, "Mouse Cell Cycle RT² ProfilerTM PCR Array", per la determinazione dei livelli di espressione di mRNA delle cicline regolatrici del ciclo cellulare: Ciclina A1, Ciclina A2, Ciclina B1, Ciclina B2, Ciclina C1, Ciclina D1, Ciclina E1 e Ciclina F.

Durante il differenziamento (72 ore dopo l'induzione), utilizzando la piastra array "Custom Mouse RT² ProfilerTM PCR Array CAPM-0836", appositamente disegnata, è stato possibile effettuare lo studio dei livelli di espressione genica dei principali MRFs e di proteine marker di differenziamento: Myf-5, MyoD, Myf-6, Miogenina e MyHC.

L'RNA totale è stato isolato dalle cellule C2C12 nella fase proliferativa e alle 72 ore del processo di differenziamento, mediante l'impiego del kit di estrazione RNeasy Plus Mini Qiagen Kit (Qiagen GmbH, Germany).

L'RNA totale (1 µg) è stato quindi retrotrascritto utilizzando il kit di retro trascrizione RT² First Strand Kit (SABiosciences Corporation, Frederick, MD 21703 USA).

Il template ottenuto a seguito della reazione di retrotrascrizione ha rappresentato il campione per l'allestimento delle piastre array prima descritte.

Ogni campione è stato effettuato in triplo.

La normalizzazione dei campioni di ogni condizione sperimentale è stata effettuata sui livelli di espressione dei geni housekeeping.

Per ogni gene analizzato si è quindi proceduto al calcolo del fold-change dei cicli soglia ($\Delta\Delta C_t$) del template trattato con resveratrolo comparandolo al gruppo di controllo.

Se il $\Delta\Delta C_t$ è superiore al valore numerico 1, il dato osservato indica una up-regolazione genica.

Se il $\Delta\Delta C_t$ è invece inferiore al valore numerico 1, il risultato viene interpretato come down-regolazione genica.

Metodi di quantificazione

- **Quantificazione assoluta**

La quantificazione assoluta determina il numero di copie, in valore assoluto, della sequenza target nel campione. Questa quantità viene estrapolata paragonando il Ct del gene target con una curva standard. Questa viene preparata con una serie di diluizioni di una soluzione del gene target di cui sia nota la concentrazione precisa.

- **Quantificazione relativa**

La curva standard viene allestita utilizzando una serie di diluizioni di un campione definito “di riferimento”, in cui è presente il gene di interesse. Le unità usate per definire la serie di diluizioni non sono valori assoluti, ma possono essere espresse come fattori di diluizione oppure come concentrazioni di RNA totale.

I valori relativi del gene target nei campioni vengono estrapolati dalla curva standard. Un campione viene designato come “calibratore” e fissato pari a 1 e i livelli di espressione relativa di tutti gli altri campioni vengono espressi relativamente al campione “calibratore”.

L'accuratezza dell'esperimento può essere notevolmente perfezionata normalizzando i valori di espressione relativa ottenuti per il gene di interesse con i valori di espressione relativa ottenuti per un gene housekeeping che mantiene la sua espressione invariata in diverse condizioni sperimentali e fra campioni diversi (ad esempio cellule di controllo C2C12 e cellule trattate con resveratrolo).

3.4 IMMUNOFLUORESCENZA

La tecnica di immunofluorescenza consente di mettere in evidenza la presenza di antigeni in cellule o in tessuti attraverso l'utilizzo di anticorpi specifici. Le reazioni di immunofluorescenza possono essere eseguite con metodo diretto o indiretto.

La reazione di immunofluorescenza diretta prevede l'incubazione con un anticorpo, rivolto verso l'antigene di interesse, coniugato con una molecola fluorescente. Nella metodica indiretta la reazione tra l'antigene e l'anticorpo viene rivelata attraverso l'utilizzo di un anti anticorpo specie-specifico coniugato con un fluorocromo.

I fluorocromi più comunemente utilizzati sono l'isotiocianato di fluoresceina (FITC) e la rodamina.

I complessi fluorescenti possono essere visualizzati al microscopio a luce ultravioletta.

In questo studio è stata utilizzata l'immunofluorescenza di tipo indiretto e sono state analizzate cellule in stato di attiva proliferazione, a vari tempi dall'induzione del differenziamento e a differenziamento completato.

•Fissazione con paraformaldeide

Le cellule sono state fissate in paraformaldeide al 4% (PFA 4% w/v) in PBS a pH 7.4.

Dopo aver aspirato il medium di coltura, le cellule sono state lavate con PBS, è stata quindi aggiunta la paraformaldeide, e lasciata agire per 10 minuti a temperatura ambiente. Al termine le cellule sono state lavate in PBS.

Le cellule fissate possono essere analizzate in immunofluorescenza oppure possono essere conservate in PBS contenente NaN_3 allo 0.02% (w/v) a 4°C.

•Permeabilizzazione con Triton X-100 e bloccaggio dei siti di legame aspecifici

Le cellule sono state incubate con PBS contenente bovina serum albumine (BSA) al 1% (w/v) e Triton X-100 (TX-100) allo 0.2% (w/v) per 30 minuti a temperatura ambiente per permeabilizzarle e bloccare i siti di legame aspecifici con i quali l'anticorpo potrebbe interagire.

Al termine le cellule sono state lavate con PBS.

•Incubazione con l'anticorpo primario

Le cellule sono state quindi incubate con gli anticorpi primari, diluiti in PBS contenente BSA 1% (w/v) e TX-100 0.2% (w/v), a temperatura ambiente per 2 ore.

•Incubazione con l'anticorpo secondario coniugato con un fluorocromo

Al termine dell'incubazione, le cellule sono state lavate tre volte con PBS contenente BSA 1% (w/v) e TX-100 0.2% (w/v) e incubate, 2 ore a temperatura ambiente, con i corrispondenti anticorpi secondari coniugati con rodamina diluiti in PBS contenente BSA 1% (w/v) e TX-100 allo 0.2% (w/v).

L'incubazione è stata condotta al buio in modo da evitare il decadimento del fluorocromo.

Per controllare che non sia presente un segnale aspecifico dell'anticorpo secondario fluorescente, sono state preparate delle piastre trattate con il solo anticorpo secondario che fungono da bianchi.

Successivamente le piastre sono state lavate con PBS e le cellule osservate mediante l'uso di un microscopio a fluorescenza (Leica DM IRE2), collegato ad un analizzatore di immagini IM50 software (Leica Microsystems, Switzerland), per lo studio delle modificazioni morfologiche e i parametri dimensionali.

Le immagini ottenute sono state in seguito analizzate mediante l'impiego del programma informatico Adobe® Photoshop® CS4.

Per la determinazione dei parametri dimensionali lunghezza e diametro dei miotubi formati, i conteggi sono stati effettuati su un numero di almeno 150 miotubi per volta. All'interno della piastra di coltura, sono stati scelti in maniera casuale 10 campi di conteggio, considerando tutti i miotubi multinucleati positivi per la proteina MyHC in cui fossero presenti almeno 3 nuclei.

I dati così ottenuti sono stati quindi convertiti in valore di incremento percentuale rispetto al controllo differenziativo.

•Colorazione dei nuclei con DAPI (4',6-Diamidino-2-fenilindolo cloridrato)

I nuclei sono stati colorati con una soluzione di DAPI (4',6-Diamidino-2-fenilindolo cloridrato), un colorante per la colorazione in fluorescenza appartenente al gruppo dei derivati dall'indolo, che viene impiegato per la colorazione di DNA, nuclei, cellule vive e per la contro colorazione in immunofluorescenza.

Dopo incubazione per 30 minuti a temperatura ambiente ed al riparo dalla luce, le cellule sono state lavate 2 volte con PBS e osservate al microscopio a fluorescenza.

3.5 WESTERN BLOT

Il metodo convenzionale per analizzare le proteine prodotte da una cellula utilizza l'elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di sodio dodecilsolfato (SDS polyacrilamide gel electrophoresis, SDS-PAGE).

In generale, se l'analisi viene effettuata solamente mediante colorazione del gel con un generico colorante per proteine, si hanno troppe proteine per fornire un quadro chiaro del completo profilo proteico, sebbene una maggiore risoluzione possa essere ottenuta mediante elettroforesi bidimensionale.

Le tecniche generalmente applicabili per l'identificazione di una specifica proteina, e quindi per l'analisi della sua espressione, si basano sull'uso di anticorpi specifici in combinazione con l'SDS-PAGE.

Dopo un frazionamento degli estratti cellulari mediante SDS-PAGE, le proteine vengono trasferite su una membrana mediante il passaggio attraverso il gel e la membrana di una corrente perpendicolare; infine una specifica proteina o delle proteine potranno essere identificate usando anticorpi specifici direttamente marcati o identificati in una seconda fase utilizzando un anticorpo secondario specie-specifico marcato.

La tecnica identifica non solo la presenza o l'assenza di una proteina che reagisce con l'anticorpo, ma fornisce anche una stima semi-quantitativa della sua dimensione e del livello relativo di espressione.

3.5.1 SDS-PAGE

L'elettroforesi in poliacrilammide in presenza di sodio dodecil solfato (SDS) permette di separare le proteine denaturate dal SDS in base al loro peso molecolare.

Questa metodica è stata eseguita secondo il metodo discontinuo di King e Laemmli (1971) [211] utilizzando un apparato per minigel della Biorad.

Il gel è costituito da due parti, differenti tra loro per porosità e pH del tampone utilizzato per la loro preparazione, denominate stacking gel e running gel.

Lo stacking gel viene stratificato sopra il running gel quando quest'ultimo ha polimerizzato e in questo gel il campione si concentra.

Il running gel è il gel di corsa nel quale avviene la separazione delle proteine. Viene preparato con una concentrazione diversa di poliacrilammide in base al peso molecolare delle proteine che devono essere separate.

Le cellule C2C12 trattate con resveratrolo e le cellule controllo sono state omogeneizzate in un buffer di lisi (50 mM Tris/HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM sodio ortovanadato (Na_3VO_4), 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mg/ml aprotinina, 1 mg/ml leupeptina, 1 mg/ml pestatina) per un'ora alla temperatura di 4°C. Successivamente sono state eliminate dai campioni le sospensioni insolubili e il detergente mediante centrifugazione a 12,000 x g per 30 minuti.

Il contenuto proteico dei campioni è stato quantificato mediante il metodo di dosaggio proteico secondo il metodo colorimetrico di Bradford [212], utilizzando il kit commerciale Pierce.

Dosaggio delle proteine secondo Bradford

Questo dosaggio si basa sullo "shift" di assorbanza del colorante Comassie Blu G-250, che si verifica quando una soluzione acida di tale colorante si lega alle proteine, che ne stabilizzano la fase anionica, mediante interazioni sia ioniche che idrofobiche.

Il dosaggio è stato effettuato in doppio ed è stata allestita una curva standard con albumina.

L'assorbanza è stata letta su uno spettrofotometro (Amherham) alla lunghezza d'onda di 565 nm, contro il bianco.

Dalla lettura degli standard di BSA è stato possibile creare una retta di taratura attraverso la quale risalire al contenuto proteico dei campioni in esame.

Preparazione dei campioni e corsa elettroforetica

Aliquote dei campioni corrispondenti a 30 µg di proteine sono state separate in SDS-PAGE.

I campioni, a cui è stato aggiunto un tampone contenente glicerolo, blu di Bromofenolo, SDS e 2-mercaptoetanololo, sono stati bolliti per 5 minuti al fine di permettere la denaturazione completa delle proteine e successivamente caricati sul gel.

La corsa elettroforetica è stata condotta ad una corrente costante di 130 V.

3.5.2 IMMUNOBLOTTING

Al termine della corsa elettroforetica le proteine separate in SDS-PAGE sono state trasferite su membrane di nitrocellulosa (Protran®, Whatman® Schleicher & Schuell) come descritto [213].

Le membrane sono state incubate overnight in una soluzione di Tris Buffered Saline (TBS) + 0.1 % (v/v) Tween 20 (TBS-T) contenente latte in polvere fat free al 5% (w/v) per saturare i siti di legame aspecifici.

Dopo aver effettuato alcuni lavaggi in TBS-T, le membrane sono state incubate con gli specifici anticorpi primari e dopo con gli anticorpi secondari specie-specifici coniugati con perossidasi.

Tutte le incubazioni sono state eseguite sotto agitazione costante.

Dopo tre lavaggi in TBS-T, si è proceduto alla rivelazione delle bande tramite tecnica ECL (Enhanced Chemiluminescence) utilizzando un chemiluminescente (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA).

La tecnica ECL si basa su un fenomeno di chemiluminescenza e consente di evidenziare specifici antigeni immobilizzati, coniugati direttamente o indirettamente con anticorpi legati alla perossidasi di rafano. La soluzione del kit contiene H₂O₂, luminolo ed un “chemical enhancer”.

La perossidasi catalizza la seguente reazione:



L’ossigeno liberato ossida il luminolo che emette luce.

Il chemical enhancer aumenta l’emissione. La luce emessa impressiona la lastra fotografica durante un’esposizione per un tempo variabile in funzione dell’intensità del segnale.

La quantificazione delle bande è stata effettuata mediante un’analisi densitometrica utilizzando il programma informatico Scion Image Software (Scion corporation, Frederick, MD, USA), inoltre, allo scopo di verificare l’effettiva concentrazione proteica analizzata per ogni campione, sono stati scelti anche due controlli interni rappresentati dalle proteine Calnexina e Alfa Tubulina.

I dati ottenuti sono stati presentati come fold-change (FC) rispetto al controllo.

3.6 ANALISI STATISTICA

Tutti i dati presentati sono stati ottenuti da almeno tre prove sperimentali.

Per gli studi in western blot ed immunofluorescenza indiretta le analisi statistiche sono state condotte utilizzando il metodo statistico del t-test.

I dati sperimentali sono stati presentati come media \pm deviazione standard. I risultati sono stati considerati statisticamente significativi se $p \leq 0,05$.

4. RISULTATI

4.1 ESPERIMENTO DOSE/RISPOSTA

Gli esperimenti preliminari sono stati eseguiti al fine di determinare le dosi di resveratrolo più efficaci da utilizzare nei trattamenti cellulari.

Oltre alla ricerca in letteratura [202,210], sono state eseguite prove di dose/risposta al termine del processo di differenziamento, nella fase considerata di post-differenziamento, ovvero dopo 72 ore dall'induzione (*Figura 3.1* sezione Materiali e Metodi).

Per questi studi preliminari, effettuati mediante saggi di western blot, sono stati valutati i livelli di espressione, nella fase post-differenziativa, della proteina marker del differenziamento terminale MyHC. I miotubi di nuova formazione sono stati sottoposti al trattamento con tre differenti concentrazioni di resveratrolo: 0,1 μM , 10 μM e 25 μM .

In *Figura 4.1* è possibile osservare i livelli di espressione proteica di MyHC. Evidente la differenza nell'effetto sui livelli di MyHC delle due dosi 0,1 e 25 μM , statisticamente significative in ognuno dei tempi analizzati, rispetto all'effetto riscontrato con la concentrazione intermedia di 10 μM (RSV 0,1 e 25 μM vs DM 8 h e 24 h $p \leq 0,05$).

Questi risultati, ottenuti da tre differenti esperimenti, unitamente alle prima citate referenze bibliografiche, hanno portato a scegliere le dosi 0,1 e 25 μM per i trattamenti cellulari.

Interessante notare come in letteratura siano presenti diversi lavori scientifici, tra cui quelli prima indicati, in cui, per gli esperimenti in vitro, sono state impiegate concentrazioni di resveratrolo superiori a quelle scelte in questo elaborato. La ragione dell'utilizzo di dosi più basse in questo lavoro è da ricercare nell'obiettivo primario di studiare gli effetti di questo polifenolo sul processo differenziativo, senza però minimamente indurre citotossicità cellulare.

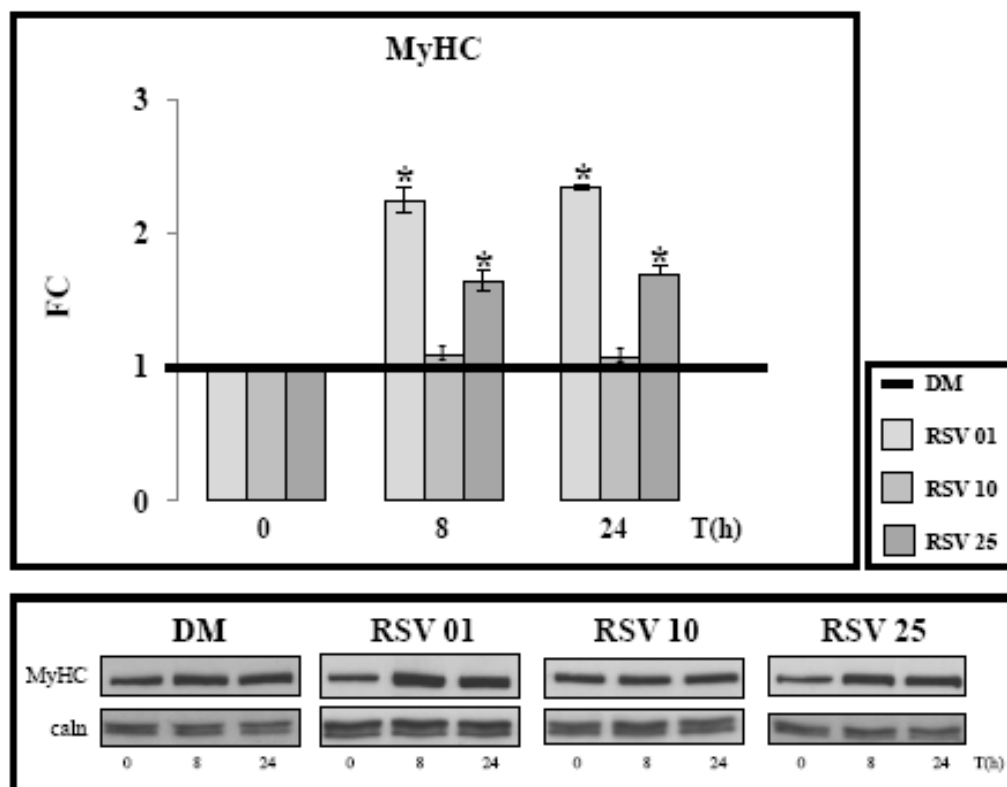


Figura 4.1 : *Livelli di espressione proteica del marker di differenziamento terminale MyHC nella fase di post-differenziamento, valutati mediante analisi di western blot. I dati sono presentati come incremento rispetto al controllo. * $p \leq 0,05$.*

In basso sono riportate le bande corrispondenti alle proteine analizzate.

4.2 STUDIO DELLA FASE PROLIFERATIVA

Nel corso della fase proliferativa è stato valutato come il trattamento con le due diverse dosi di resveratrolo influenzi la crescita cellulare, le caratteristiche morfologiche, i livelli di espressione genica e il contenuto proteico delle cellule C2C12.

Lo schema sperimentale illustrato nella sezione Materiali e Metodi (*Figura 3.1*) descrive i diversi tempi di trattamento e soprattutto come il controllo negativo è rappresentato dalle cellule non trattate cresciute sia in un terreno GM (controllo proliferativo) che DM (controllo differenziativo). Si è scelto di inserire il controllo DM anche nelle prove sperimentali della fase proliferativa per poter effettuare dei confronti tra le cellule stimulate con resveratrolo e le cellule cui vengono sottratti i principali nutrienti allo scopo di indurre il processo differenziativo.

Con l'intento di determinare l'effetto del resveratrolo sulla capacità proliferativa cellulare sono state realizzate ripetute curve di crescita. La cinetica di crescita delle C2C12 appare rallentata durante i primi due giorni di coltura, mentre le divisioni cellulari aumentano sensibilmente nel corso del terzo giorno di curva di crescita.

Come è possibile osservare in *Figura 4.2*, il trattamento con resveratrolo induce un decremento dei fenomeni mitotici, possibile conseguenza dell'arresto nella progressione del ciclo cellulare.

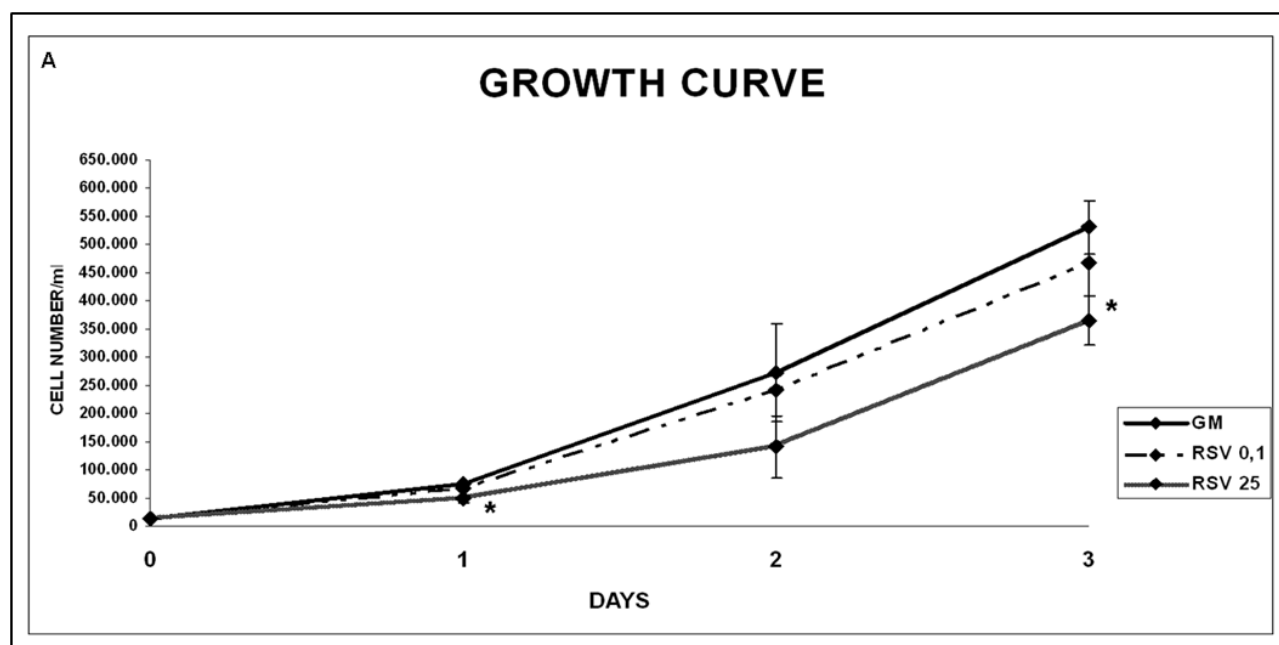


Figura 4.2 : *Curva di crescita delle C2C12 controllo e delle C2C12 trattate con resveratrolo 0,1 e 25 μ M durante la fase di proliferazione. I dati rappresentano la media \pm SD. * $p \leq 0,05$.*

Tale effetto mostra una dipendenza dalla dose somministrata: la minor concentrazione di resveratrolo induce infatti un effetto minimo sulla cinetica di crescita cellulare, mentre la dose maggiore ha un effetto rilevante sulla diminuzione della proliferazione, rispetto alle cellule controllo. (Giorno 1: RSV 25 μ M vs GM $p \leq 0,05$; Giorno 3: RSV 25 μ M vs GM $p \leq 0,05$).

Un'importante prova a sostegno delle variazioni osservate nella cinetica di crescita deriva dalla quotidiana osservazione della morfologia cellulare al microscopio ottico a contrasto di fase: le C2C12 cresciute in GM mostrano una forma tipicamente tondeggiante, la loro densità risulta molto elevata e le cellule sono molto più compatte, tutte manifestazioni tipiche di un'attiva fase proliferativa (Figura 4.3) [73,81,208,209].

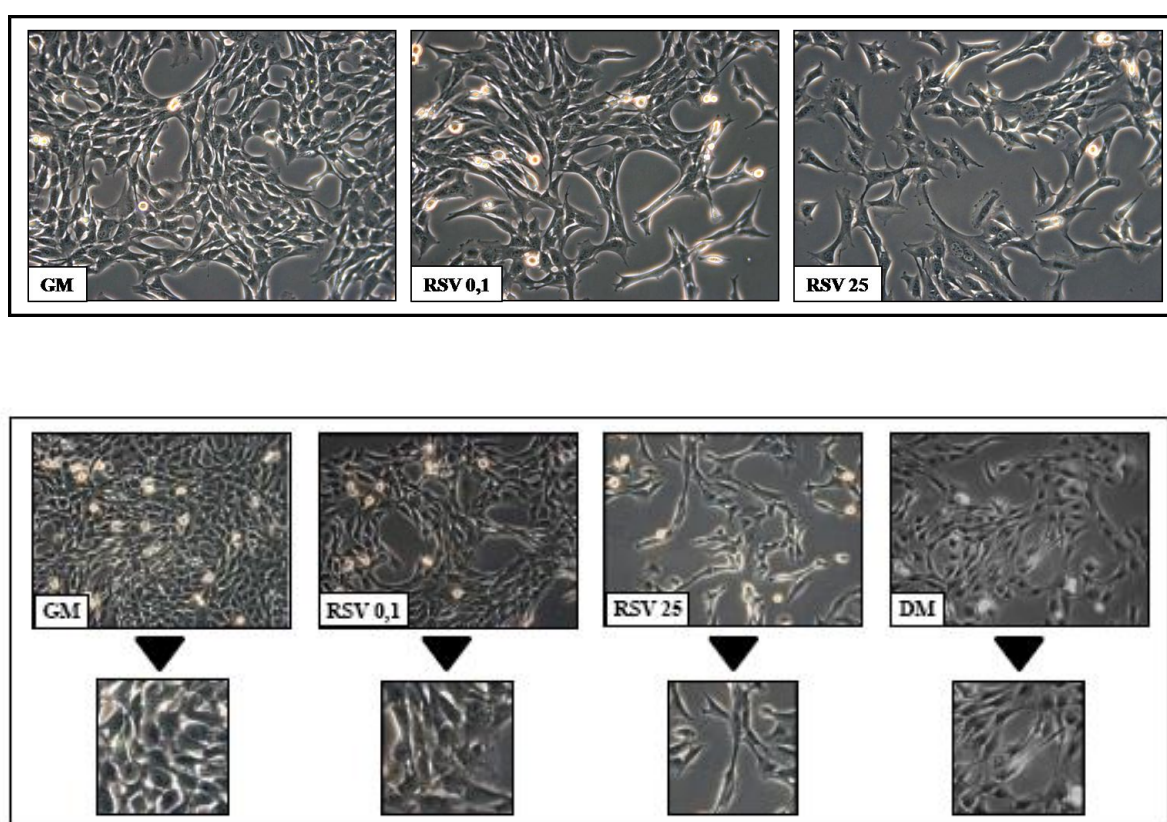


Figura 4.3 : *Morfologia cellulare delle C2C12 e delle C2C12 trattate con resveratrolo 0,1 e 25 μ M al terzo giorno di curva di crescita. Nel pannello in basso è possibile osservare un confronto più dettagliato della forma nelle quattro condizioni di coltura. Fotografie al microscopio a contrasto di fase, ingrandimento 20x.*

Le cellule trattate con resveratrolo, invece, oltre a manifestare una minore densità cellulare, sembrano perdere la loro caratteristica forma tondeggiante per assumere una morfologia più allungata, in particolare le foto in contrasto di fase, ottenute al microscopio ottico ad ingrandimento 20X, in *Figura 4.3* confermano questi cambiamenti morfologici.

Inoltre, è interessante notare come la morfologia delle C2C12 trattate con resveratrolo si discosti da quella delle cellule controllo (GM), ma sia ben sovrapponibile a quella delle cellule fungenti da controllo del processo differenziativo.

Queste due evidenze sperimentali, ottenute da diverse prove ripetute, suggeriscono un possibile ruolo del resveratrolo nel controllo della progressione del ciclo cellulare: una sua possibile azione mirata all'uscita guidata delle cellule dal ciclo, promuovendo in tal modo l'induzione del processo di differenziamento.

Il cambiamento morfologico, inoltre, porta a considerare come l'importante e finemente regolata acquisizione di un determinato fenotipo miogenico sia condizione necessaria all'attivazione del differenziamento nelle cellule muscolari [67,73].

Alla luce di queste osservazioni preliminari, si è ritenuto necessario confermare il possibile effetto del resveratrolo sul decremento della proliferazione cellulare, mediante l'analisi dell'espressione genica dei principali regolatori della progressione e dell'arresto del ciclo cellulare: le cicline e le rispettive chinasi ciclina-dipendenti, durante la fase proliferativa (24 h).

La cronologia di attivazione e de-attivazione di questi regolatori è ormai ampiamente delucidata in letteratura [65,79,106,108,110,111].

L'induzione del processo di differenziamento coincide con la diminuzione dei livelli di espressione di mRNA delle principali cicline, e le cellule, bloccate nella fase G1 del ciclo, escono dalla via proliferativa per iniziare il percorso differenziativo.

L'analisi quantitativa dell'espressione genica è stata condotta mediante Real-Time-PCR durante la fase proliferativa (24 ore).

Gli array mostrano come l'effetto del trattamento con resveratrolo sia in grado di influenzare l'espressione genica delle cellule rispetto alle cellule di controllo (*Figura 4.4*).

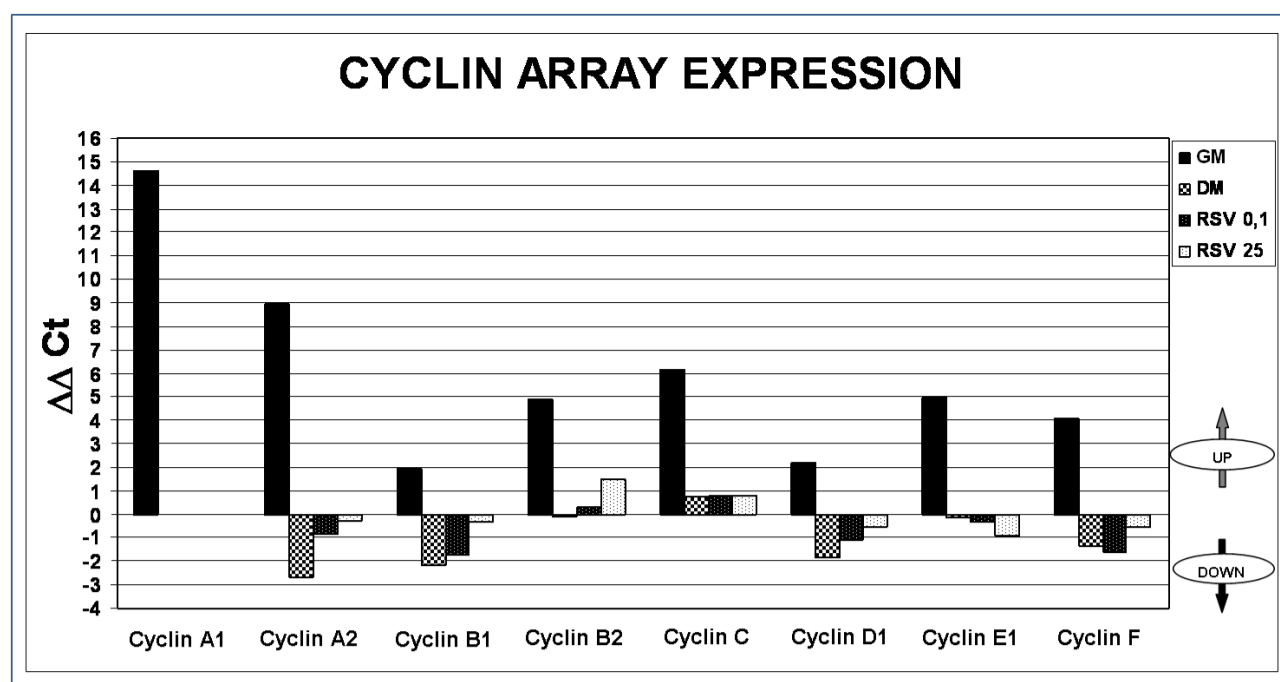


Figura 4.4 : *Espressione genica delle cicline regolatorie del ciclo cellulare nella fase proliferativa (24 ore) valutata in Real Time PCR.*

Lo stimolo con resveratrolo (nelle due dosi 0,1 e 25 μ M) causa una riduzione nei livelli di mRNA delle principali cicline studiate: Ciclina A1, Ciclina A2, Ciclina B1, Ciclina B2, Ciclina C1, Ciclina D, Ciclina E1 e Ciclina F, rispetto ai livelli di espressione delle stesse osservati nelle cellule fungenti da controllo proliferativo (*Figura 4.4*). L'andamento dei livelli di espressione dell'mRNA nelle cellule trattate segue l'andamento riscontrato nelle cellule di controllo differenziativo, come già rilevato in precedenza (*Figura 4.4*).

A seguito dell'analisi dell'espressione genica, allo scopo di ottenere ulteriori conferme della possibile azione del resveratrolo sull'arresto della fase proliferativa, sono stati determinati i livelli di espressione proteica di p21, uno dei principali fattori di regolazione del ciclo cellulare, e di alcuni fattori di regolazione miogenica precoci, tra cui MyoD (*Figura 4.5*).

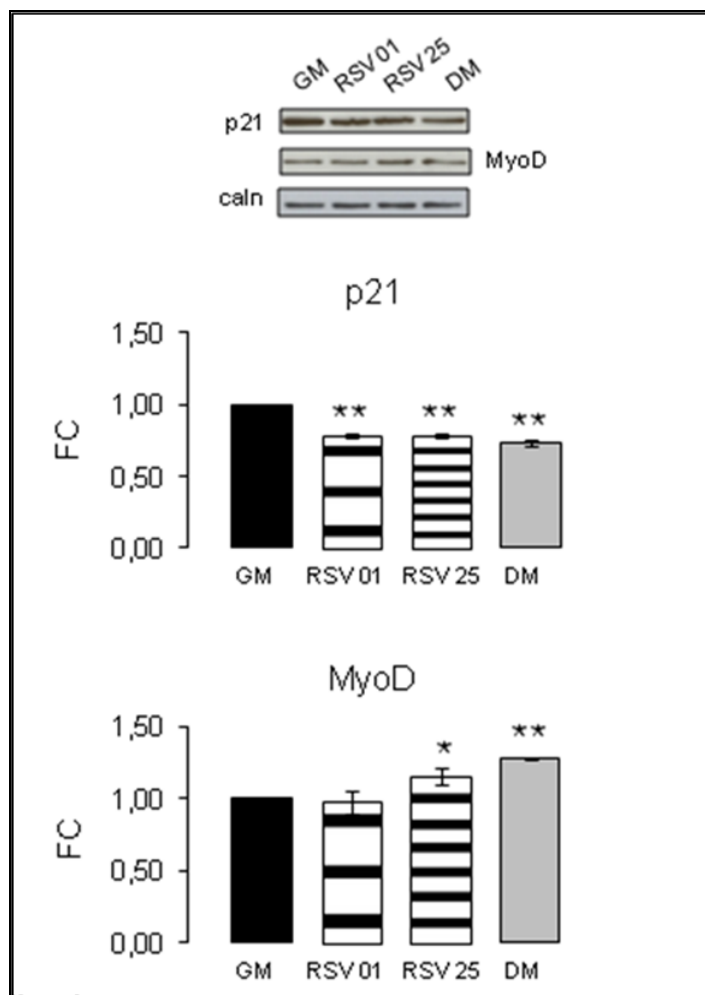


Figura 4.5 : *Livelli di espressione proteica delle proteine regolatrici p21 e MyoD nella fase proliferativa, valutati mediante analisi di western blot. I dati sono presentati come incremento rispetto al controllo. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.*

In alto sono riportate le bande corrispondenti alle proteine analizzate.

Il trattamento con le due dosi di resveratrolo, 0,1 e 25 μM , induce un decremento significativo nei livelli della proteina p21 rispetto ai livelli riscontrati nelle cellule di controllo proliferativo, come è possibile osservare nel grafico riportato in *Figura 4.5* (DM vs GM $p \leq 0,01$; RSV 0,1 μM vs GM $p \leq 0,01$; RSV 25 μM vs GM $p \leq 0,01$). Come sottolineato in precedenza, è importante notare come il contenuto proteico di p21 nelle cellule trattate sia sovrapponibile con i livelli della proteina rilevati nelle cellule fungenti da controllo differenziativo (*Figura 4.5*).

La proteina p21 esercita un ruolo centrale nell'uscita delle cellule dal ciclo e nell'induzione del processo differenziativo [65,109,110,111], l'effetto del resveratrolo sul contenuto proteico di p21 avvalorava ulteriormente l'ipotesi di un possibile ruolo di questo polifenolo naturale nell'anticipazione dell'arresto della proliferazione, nell'uscita dal ciclo ed nel precoce inizio del differenziamento.

I dati fino a qui presentati evidenziano come le cellule mantenute in terreno GM implementato con resveratrolo presentano una cinetica di crescita, caratteristiche morfologiche e pattern di espressione genica e proteica dei principali regolatori del ciclo cellulare sovrapponibili alle cellule in DM, supportando così l'ipotesi di un potenziale effetto di questo polifenolo nella promozione del processo di differenziamento.

Questa assunzione ha condotto all'analisi dell'espressione proteica del fattore di regolazione miogenica precoce MyoD, proteina marker negli stadi iniziali di induzione del differenziamento e protagonista principale nella determinazione del fenotipo miogenico [65,66,67,68,71,72,77,78,80].

Come è possibile osservare in *Figura 4.5*, il contenuto proteico del fattore MyoD in cellule cresciute in presenza di resveratrolo risulta significativamente maggiore rispetto alle cellule controllo.

E' importante precisare come l'effetto osservato si riferisce al trattamento con la dose maggiore di resveratrolo, la concentrazione di 0,1 μM non ha indotto differenze significative nei livelli di espressione proteica di MyoD (*Figura 4.5*) (DM vs GM $p \leq 0,01$; RSV 25 μM vs GM $p \leq 0,05$).

Gli aumentati livelli della proteina MyoD convalidano ulteriormente l'ipotizzata azione del resveratrolo nell'induzione anticipata del differenziamento miogenico.

Infine, una prova aggiuntiva a supporto delle osservazioni di natura morfologica prima descritte, è stata ottenuta mediante saggi di immunofluorescenza indiretta durante l'intera fase proliferativa (24, 48 e 72 ore). Si è voluta prendere in esame l'espressione qualitativa di un altro fattore di regolazione miogenica precoce, Myf-5, e del principale fattore di regolazione miogenica delle fasi intermedie del processo differenziativo, Myf-6.

Nella *Figura 4.6*, nella *Figura 4.7* e nella *Figura 4.8*, le foto in immunofluorescenza ed in contrasto di fase, alle diverse ore della fase proliferativa, confermano gli importanti cambiamenti morfologici osservati nelle cellule trattate con la dose maggiore di resveratrolo. Tali cambiamenti risultano meno evidenti nelle cellule stimulate con la dose minore del composto fenolico.

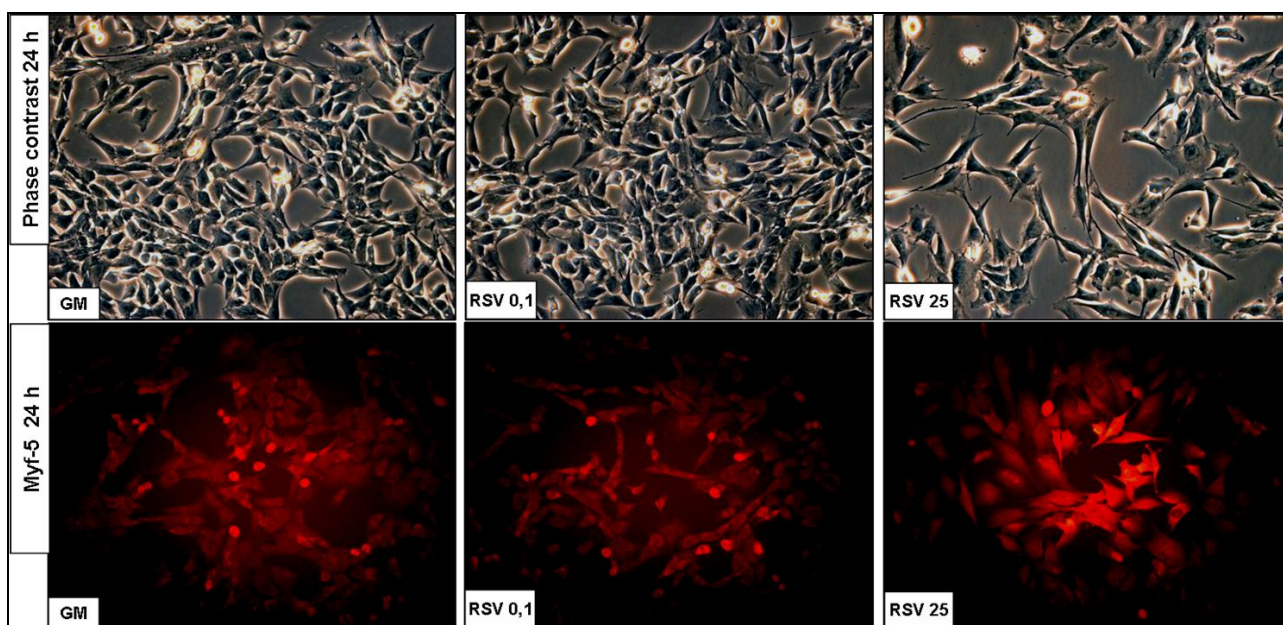


Figura 4.6 : *Studio della morfologia cellulare durante la fase proliferativa: 24 ore.*
Immagini in contrasto di fase ed immunofluorescenza anti-Myf-5, ingrandimento 20X.

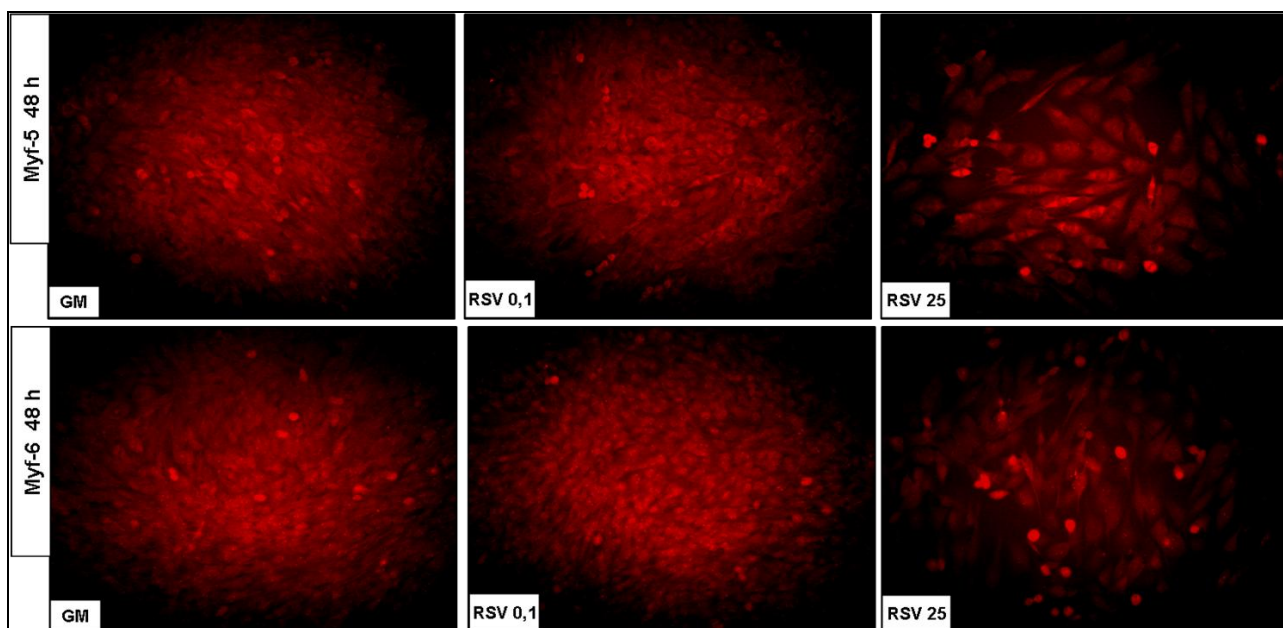


Figura 4.7 : *Studio della morfologia cellulare durante la fase proliferativa: 48 ore.*
Immagini in immunofluorescenza anti-Myf-5 e Myf-6, ingrandimento 20X.

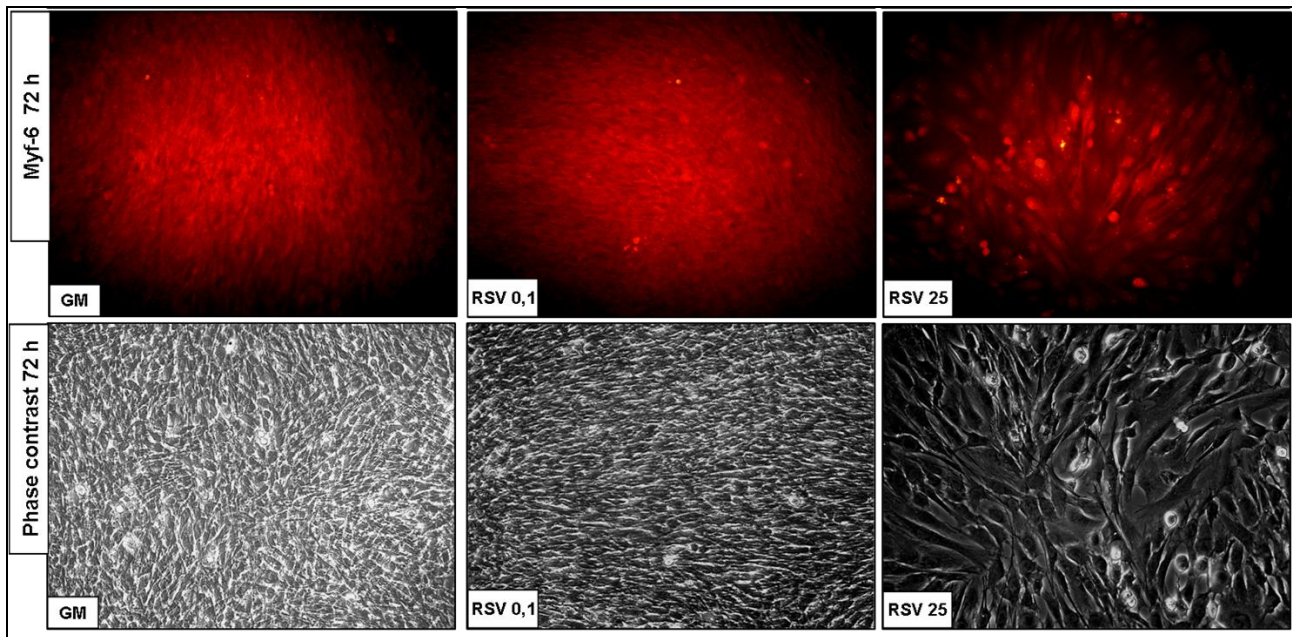


Figura 4.8 : *Studio della morfologia cellulare durante la fase proliferativa: 72 ore.*
Immagini in contrasto di fase ed immunofluorescenza anti-Myf-6, ingrandimento 20X.

Questi ultimi dati, ottenuti analizzando l'espressione di alcuni MRFs, avvalorano quindi l'idea che l'azione del resveratrolo sui principali regolatori dell'arresto del ciclo cellulare conduca ad un precoce inizio del processo differenziativo, come ulteriormente suggerito dal sovrapponibile comportamento delle cellule trattate con resveratrolo e le cellule fungenti da controllo differenziativo.

Il resveratrolo, quindi, sembra avere una funzione importante nell'acquisizione strettamente regolata del fenotipo miogenico: dalla cellula mioblastica indifferenziata ed in attiva proliferazione verso il miocita fenotipicamente determinato [66,67,73].

Gli effetti osservati nello studio della fase proliferativa e nell'acquisizione del fenotipo miogenico hanno gettato le basi per l'analisi delle successive fasi di induzione e progressione della miogenesi.

4.3 INDUZIONE E PROGRESSIONE DEL DIFFERENZIAMENTO

La successione delle diverse fasi del processo di miogenesi risulta essere finemente regolata dall'espressione sequenziale di specifici fattori di regolazione miogenica (MRFs) [65,66,71,73].

Per questa ragione, l'analisi dell'espressione genica dei principali fattori di regolazione coinvolti nelle diverse fasi ha rappresentato il punto di partenza per lo studio dell'azione del resveratrolo sull'induzione, il mantenimento ed il completamento del differenziamento.

Al tempo di 72 ore a seguito dell'induzione del differenziamento, quando il processo di formazione dei miotubi si considera quasi completo [66,73,81,209], sono stati valutati, mediante analisi di Real-Time-PCR, i livelli di mRNA dei principali markers miogenici.

Il pannello array in *Figura 4.9* descrive l'andamento dei livelli di mRNA di questi markers.

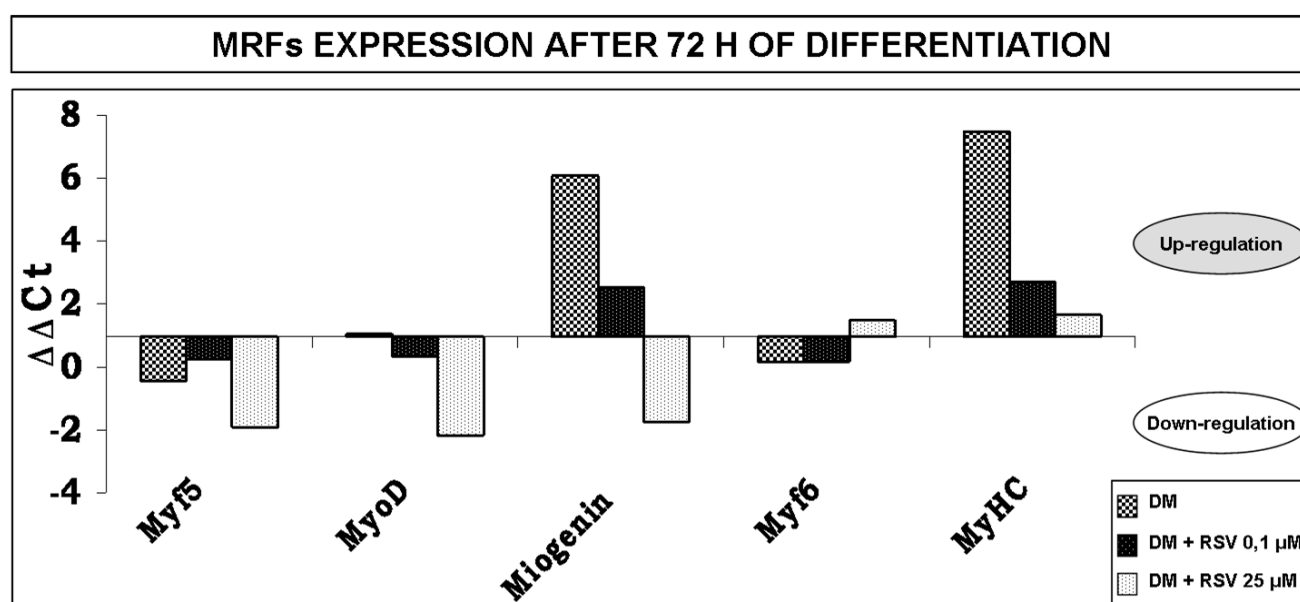


Figura 4.9 : *Espressione genica dei Fattori di Regolazione Miogenica precoci (MyoD, Myf-5), Intermedi (Miogenina, Myf-6) e del marker di differenziamento MyHC al completamento del processo differenziativo (72 ore), valutata in Real Time PCR.*

Nello specifico, nelle cellule controllo i tempi di espressione dei fattori di regolazione miogenica Myf-5, MyoD, Miogenina, Myf-6 e del principale marker di differenziamento terminale MyHC, rispecchiano i tempi riportati in letteratura [66,67,71,73], mentre nelle cellule sottoposte a trattamento con resveratrolo si osservano livelli di espressione differenti, più bassi. Questa variazione potrebbe essere dovuta ad un fenomeno anticipatorio: ossia alle 72 ore di differenziamento, le cellule stimulate con resveratrolo potrebbero aver già in gran parte espresso tali fattori, con picchi di attivazione verificatisi, verosimilmente, antecedentemente rispetto al controllo DM (*Figura 4.9*).

Questo dato potrebbe confermare l'azione ipotizzata nel corso dello studio della fase proliferativa: il resveratrolo sarebbe in grado di promuovere l'induzione del differenziamento e la sua velocità di progressione, raggiungendo quindi il completamento del processo precocemente rispetto al normale controllo differenziativo, e cioè prima delle 72 ore.

Nella *Figura 4.10* le immagini in contrasto di fase raccolte al microscopio ottico dopo 72 ore dall'induzione del differenziamento, consentono di visualizzare il quasi totale completamento del processo differenziativo: la maggior parte dei miociti è andata incontro al processo di fusione ed alla formazione delle strutture miotubulari multinucleate.

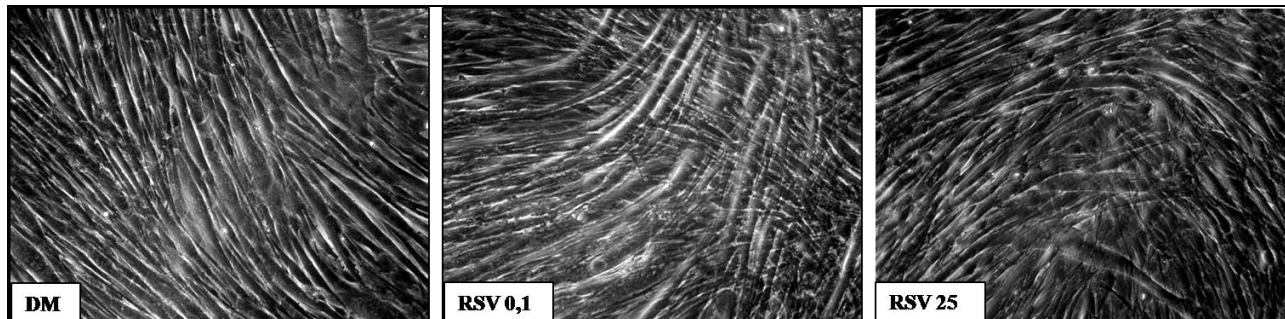


Figura 4.10 : Immagini in contrasto di fase per l'analisi morfologica durante il differenziamento, ingrandimento 20X.

Interessante osservare come la disposizione ordinata dei miotubi di nuova formazione, caratteristica della condizione di controllo differenziativo DM, non sia più così evidente nelle immagini relative alle cellule trattate con resveratrolo: i miotubi neo-formati appaiono infatti più lunghi e si possono osservare siti in cui la loro crescita è sovrapposta su più piani diversi (*Figura 4.10*).

Questa evidenza porta a supporre un effetto del resveratrolo sull'efficienza del differenziamento, valutata non solo in termini di un'aumentata percentuale di formazioni di nuovi miotubi, ma anche

del raggiungimento del completo processo differenziativo in un tempo minore rispetto a quanto si può osservare nel controllo DM.

Nell'intento di confermare questo dato ed ottenere ulteriori informazioni relative alla velocità di progressione del processo, sono stati analizzati i livelli di espressione proteica dei principali fattori di regolazione miogenica e di alcune tra le più importanti proteine muscolo-specifiche durante la fase precoce del differenziamento (24 ore), durante la fase intermedia (48 e 72 ore) e durante la fase terminale (96 ore).

La *Figura 4.11* mostra i livelli del fattore di regolazione precoce Myf-5 durante queste diverse fasi: nelle cellule esposte al resveratrolo il contenuto proteico di questo fattore risulta essere ridotto rispetto alle cellule controllo, fino a non essere più rilevabile alle 72 ore di differenziamento.

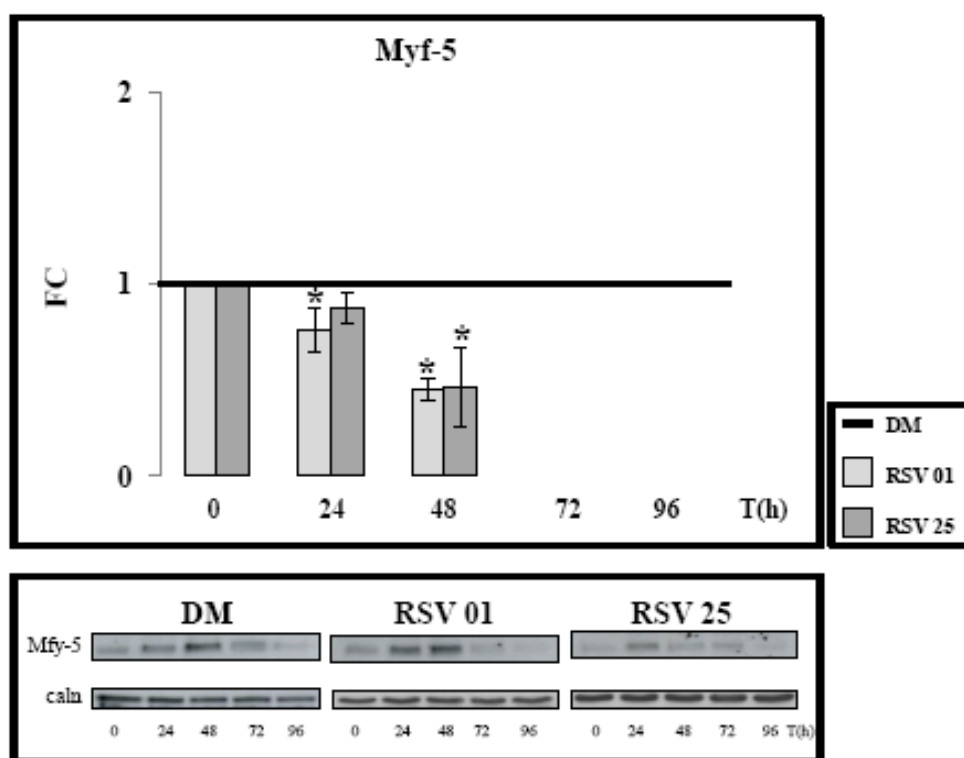


Figura 4.11 : *Livelli di espressione proteica del fattore di regolazione miogenica precoce Myf-5 durante il differenziamento, valutati mediante analisi di western blot. I dati sono presentati come incremento rispetto al controllo. * $p \leq 0,05$.*

In basso sono riportate le bande corrispondenti alle proteine analizzate.

Nella condizione di controllo differenziativo (DM), i livelli di proteina Myf-5 invece decrescono molto più lentamente e sono ancora rilevabili al completamento del processo (72 ore), seguendo l'andamento di espressione ampiamente descritto in letteratura (RSV 0,1 μ M vs DM 24 h $p \leq 0,05$; RSV 0,1 vs DM 48 h $p \leq 0,05$; RSV 25 μ M vs DM 48 h $p \leq 0,05$).

Questa analisi in western blot avvalorava l'ipotetico fenomeno anticipatorio, più volte già nominato, causato dal trattamento con resveratrolo.

L'azione di questo polifenolo, infatti, sembra indurre una precoce espressione dei fattori di regolazione miogenica iniziali e, presumibilmente, una loro disattivazione più rapida di quanto non si verificasse nel controllo differenziativo.

Un altro regolatore chiave della miogenesi è sicuramente la Miogenina, marker dell'induzione del differenziamento. Nella *Figura 4.12* si può osservare come entrambe le dosi di resveratrolo somministrate alle C2C12 siano in grado di promuovere la sintesi di questo fattore rispetto a quanto si verifica nelle cellule controllo (RSV 25 μ M 48 h $p \leq 0,05$).

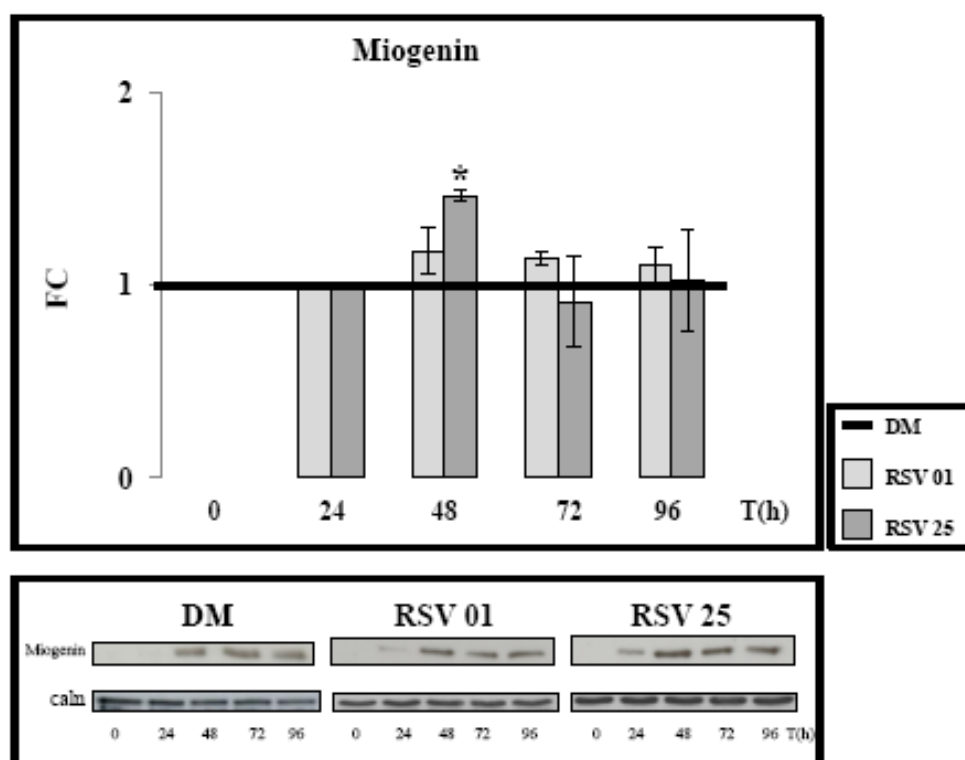


Figura 4.12 : *Livelli di espressione proteica del fattore di regolazione miogenica Miogenina durante il differenziamento, valutati mediante analisi di western blot. I dati sono presentati come incremento rispetto al controllo. * $p \leq 0,05$.*

In basso sono riportate le bande corrispondenti alle proteine analizzate.

Tra i principali marker del processo differenziativo muscolo scheletrico assume una rilevanza fondamentale lo studio dei livelli di espressione della proteina MyHC, la catena pesante della Miosina. Il grafico in *Figura 4.13* mostra un importante incremento dei livelli di questa proteina nelle cellule differenziate in presenza di resveratrolo (RSV 25 μ M 48 h e 72 h $p \leq 0,05$).

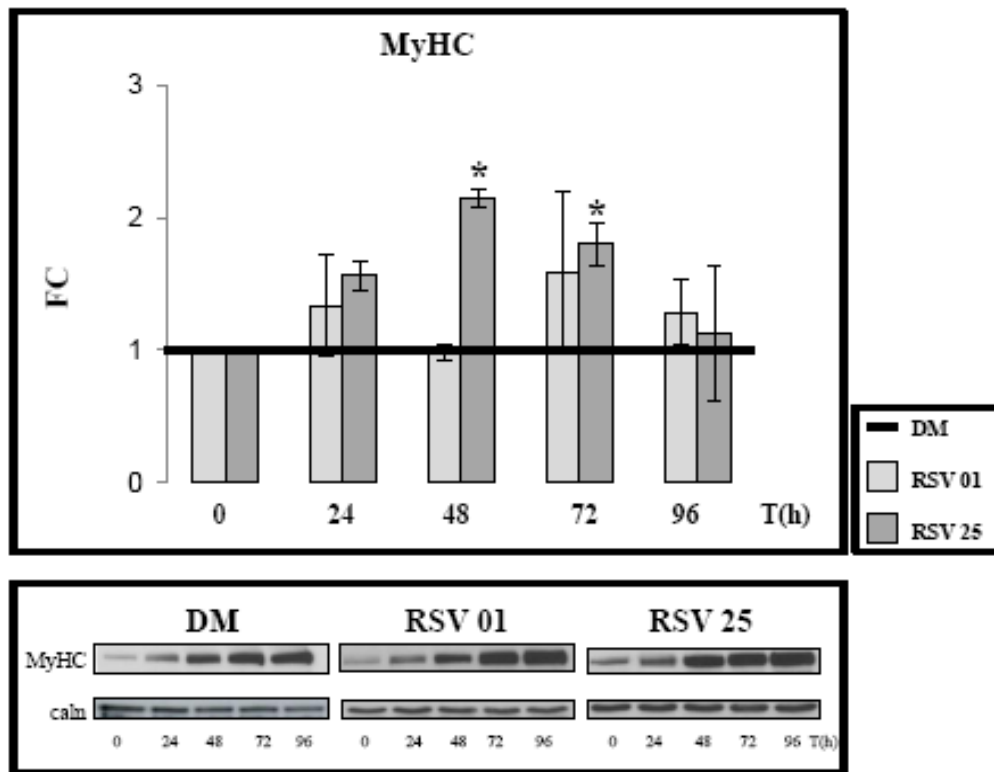


Figura 4.13 : *Livelli di espressione della proteina MyHC, marker di differenziamento terminale, durante il differenziamento, valutati mediante analisi di western blot. I dati sono presentati come incremento rispetto al controllo. * $p \leq 0,05$.*

In basso sono riportate le bande corrispondenti alle proteine analizzate.

Con l'intento di monitorare gli importanti cambiamenti morfologici, già osservati nello studio della fase proliferativa, sono stati eseguiti saggi di immunofluorescenza indiretta a 48 ore dall'induzione del differenziamento. Le immagini in *Figura 4.14 A-B* offrono un importante suggerimento sul significato dei risultati ottenuti dall'analisi in western blot.

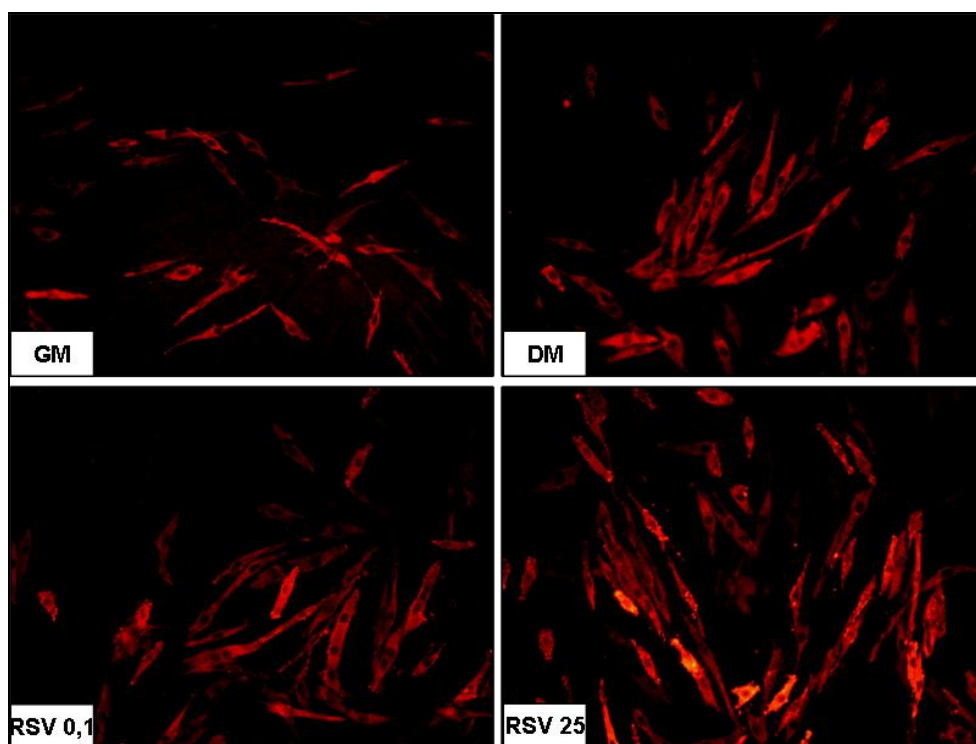


Figura 4.14 A : *Immagini in immunofluorescenza con l'anticorpo MyHC, dopo 48 ore dall'inizio del differenziamento. Ingrandimento 20X.*

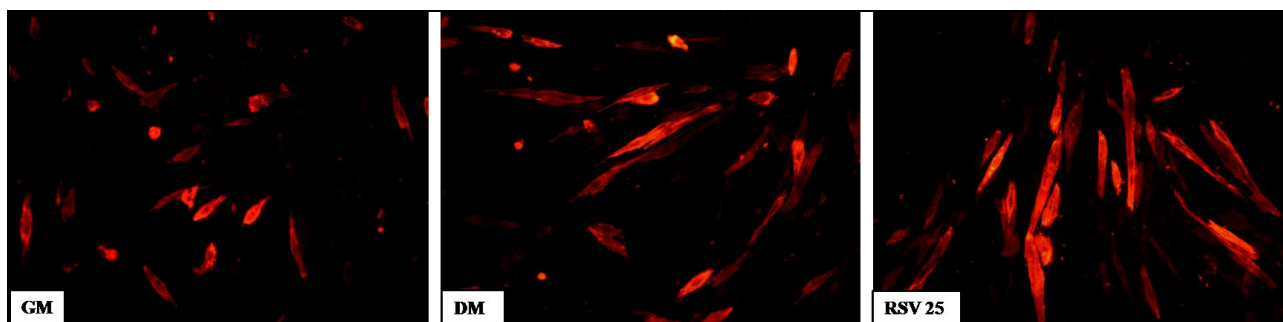


Figura 4.14 B : *Immagini in immunofluorescenza con l'anticorpo Alfa Actinina Sarcomerica, dopo 48 ore dall'inizio del differenziamento. Ingrandimento 20X.*

Nelle immagini in fluorescenza, infatti, è possibile notare un'evidente differenza nel numero di cellule positive per la proteina MyHC e per la proteina Alfa Actinina Sarcomerica [214]. La più alta densità di cellule positive per queste due proteine strutturali che si può osservare nella condizione di trattamento con resveratrolo 25 μ M rispetto alle cellule di controllo (DM), conferma ulteriormente che questo polifenolo induce una più rapida espressione di queste proteine markers, promuovendo così il raggiungimento del completo differenziamento.

Importante focalizzare l'attenzione non solo sul diverso numero di cellule esprimenti MyHC e Alfa Actinina, ma anche sulle differenze nella morfologia cellulare: nel controllo GM, le cellule, ancora distanziate le une dalle altre, hanno una dimensione ridotta ed una forma solo lievemente allungata. E' utile qui ricordare che, anche in questa condizione di controllo proliferativo GM, le C2C12 sono destinate spontaneamente alla fusione indotta dalle interazioni di membrana conseguenti al contatto, fenomeno ampiamente descritto in letteratura e noto con il nome di "Effetto Comunità" [215,216,217], cioè l'espressione di un potenziale differenziativo quando viene superata una certa densità cellulare.

Diverso appare invece l'aspetto morfologico delle cellule di controllo differenziativo DM e delle cellule stimulate con resveratrolo. Le immagini in *Figura 4.14* permettono infatti di osservare come le cellule siano più allungate ed assumano un orientamento bipolare, mostrando inoltre la presenza dei primi raggruppamenti di miociti.

Come grandemente delucidato in letteratura, la formazione dei miotubi richiede un preciso programma di fusione cellulare in cui i miociti mononucleati, avendo acquisito la competenza alla fusione, migrano verso altri miociti o verso piccoli miotubi neoformati, si allineano e stabiliscono un serrato contatto cellula-cellula mediato dalle interazioni di membrana. Questi contatti sono finemente regolati non solo a livello della membrana plasmatica ma soprattutto nello spazio intracellulare e riguardano le modificazioni di riorganizzazione del citoscheletro interne al miocita, in grado di guidare la fusione cellulare [81,103,107,136,209,214,215,216,217,218].

Tra le proteine citoscheletriche, un ruolo chiave nel processo di fusione cellulare è svolto dalla proteina N-Caderina (N-cad) [219,220].

Lo studio quantitativo in western blot dei livelli di questa proteina, principale organizzatrice dell'apparato citoscheletrico, ha rivelato un'azione rilevante del resveratrolo sulla sua espressione proteica (N-Caderina: RSV 0,1 μ M vs DM 24 h, 48 h $p \leq 0,05$; RSV 25 μ M vs DM 24 h, 48 h $p \leq 0,05$) (*Figura 4.15*).

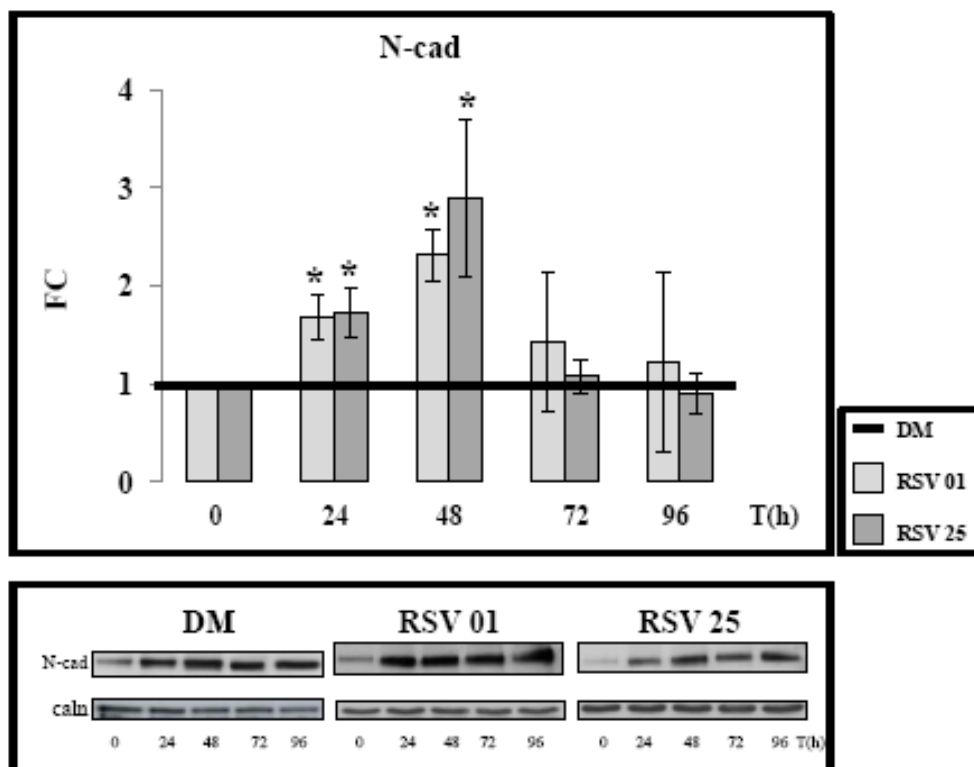


Figura 4.15 : *Livelli di espressione della proteina N-Caderina, importante proteina citoscheletrica, durante il differenziamento, valutati mediante analisi di western blot. I dati sono presentati come incremento rispetto al controllo. * $p \leq 0,05$.*

In basso sono riportate le bande corrispondenti alle proteine analizzate.

Cofattore dell'attività delle N-Caderine, la Catenina p120 assolve un ruolo altrettanto fondamentale nella fusione insieme alle proteine della famiglia delle M-Caderine. In *Figura 4.16*, l'analisi in western blot mostra l'effetto del resveratrolo sull'espressione della proteina. (p120: RSV 0,1 μ M vs DM 72 h, 96 h $p \leq 0,05$; RSV 25 μ M vs DM 72 h, 96 h $p \leq 0,05$).

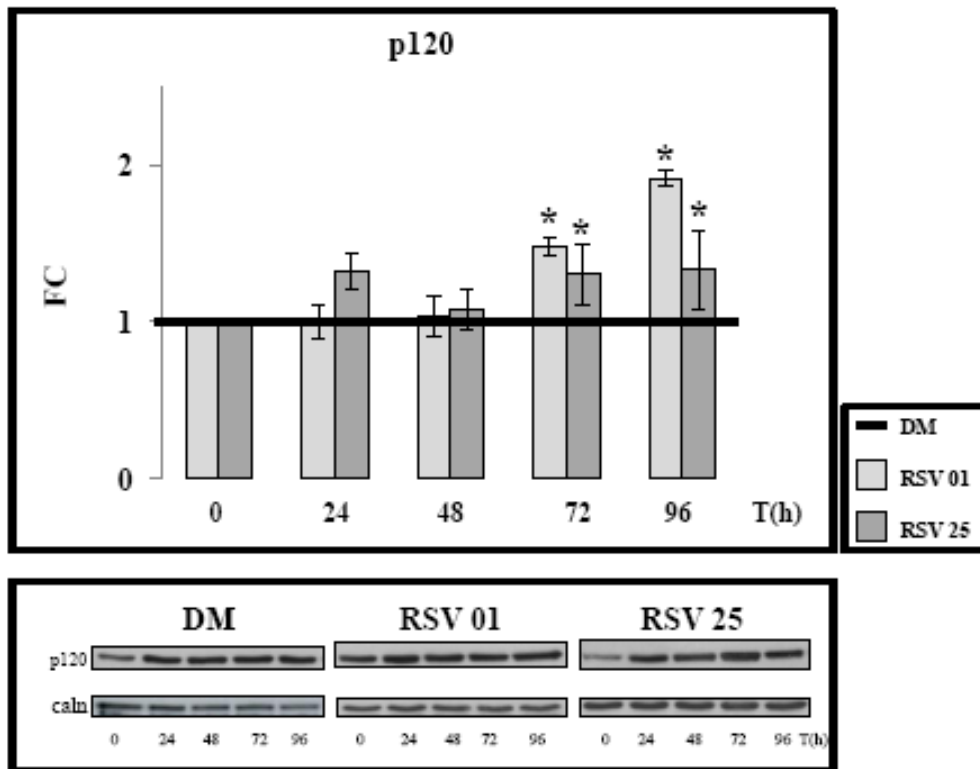


Figura 4.16 : *Livelli di espressione proteica della Catenina p120 durante il differenziamento, valutati mediante analisi di western blot. I dati sono presentati come incremento rispetto al controllo. * $p \leq 0,05$.*

In basso sono riportate le bande corrispondenti alle proteine analizzate.

La proteina strutturale Alfa Actinina Sarcomerica svolge un ruolo cruciale anche nel processo di fusione. L'azione rilevante del resveratrolo sulla sua espressione è mostrata in *Figura 4.17* (Alfa Actinina Sarcomerica: RSV 0,1 μ M vs DM 24 h, 72 h, 96 h $p \leq 0,05$; RSV 25 μ M vs DM 24 h, 48 h, 72 h, 96 h $p \leq 0,05$).

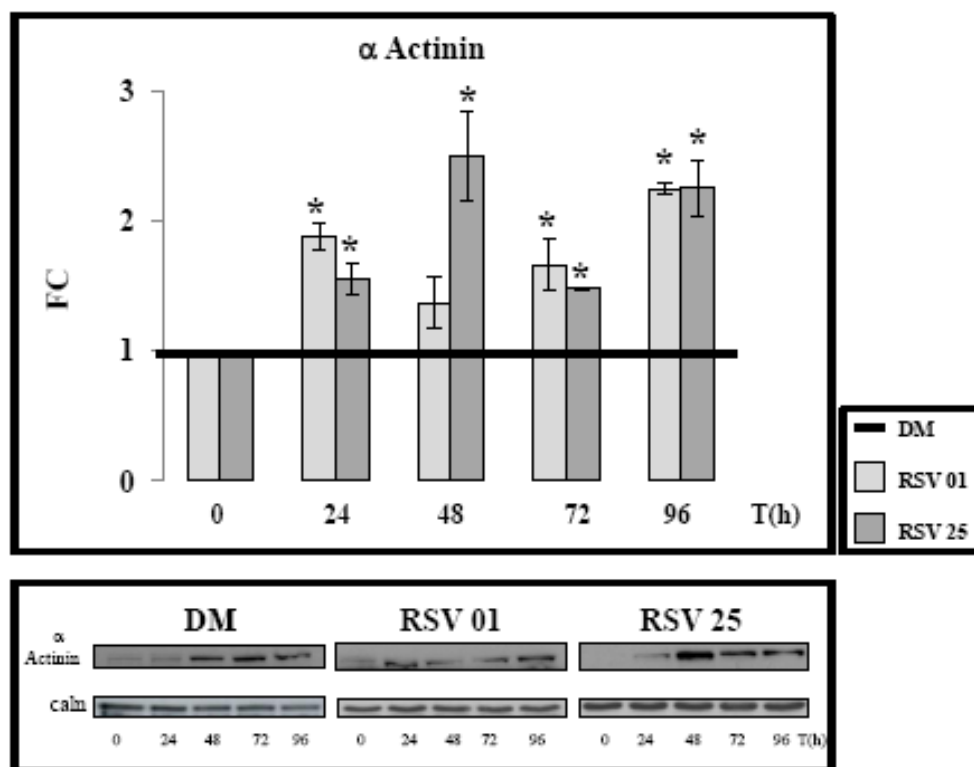


Figura 4.17 : *Livelli di espressione della proteina Alfa Actinina Sarcomerica, fondamentale regolatore strutturale, durante il differenziamento, valutati mediante analisi di western blot. I dati sono presentati come incremento rispetto al controllo. * $p \leq 0,05$.*

In basso sono riportate le bande corrispondenti alle proteine analizzate.

Anche questi dati hanno, quindi, evidenziato l'effetto del resveratrolo nella promozione del processo di fusione dei miociti monucleati durante i differenti stadi del processo miogenico. In cellule sottoposte a trattamento, infatti, l'incremento significativo delle suddette proteine strutturali guida e regola la formazione dei miotubi multinucleati.

Come descritto nella sezione introduttiva di questo elaborato, AMPK rappresenta il principale regolatore metabolico della cellula muscolare. La sua azione si realizza nel controllo della via di signaling intracellulare mediata da mTORC1, nella programmazione metabolica e nella plasticità della cellula muscolare, *Figura 1.8* [150,151,153,154,155].

Inoltre AMPK risulta essere una molecola bersaglio del polifenolo in esame [200,202].

Lo studio quantitativo in western blot (*Figura 4.18*) rivela un significativo incremento dei livelli di proteina AMPK nelle cellule trattate durante tutte le diverse fasi del differenziamento, rispetto al contenuto proteico riscontrato nelle cellule di controllo differenziativo (RSV 0,1 μ M vs DM 24 h, 48 h, 72 h $p \leq 0,05$; 96 h $p \leq 0,01$; RSV 25 μ M vs DM 24 h, 48 h, 72 h $p \leq 0,05$).

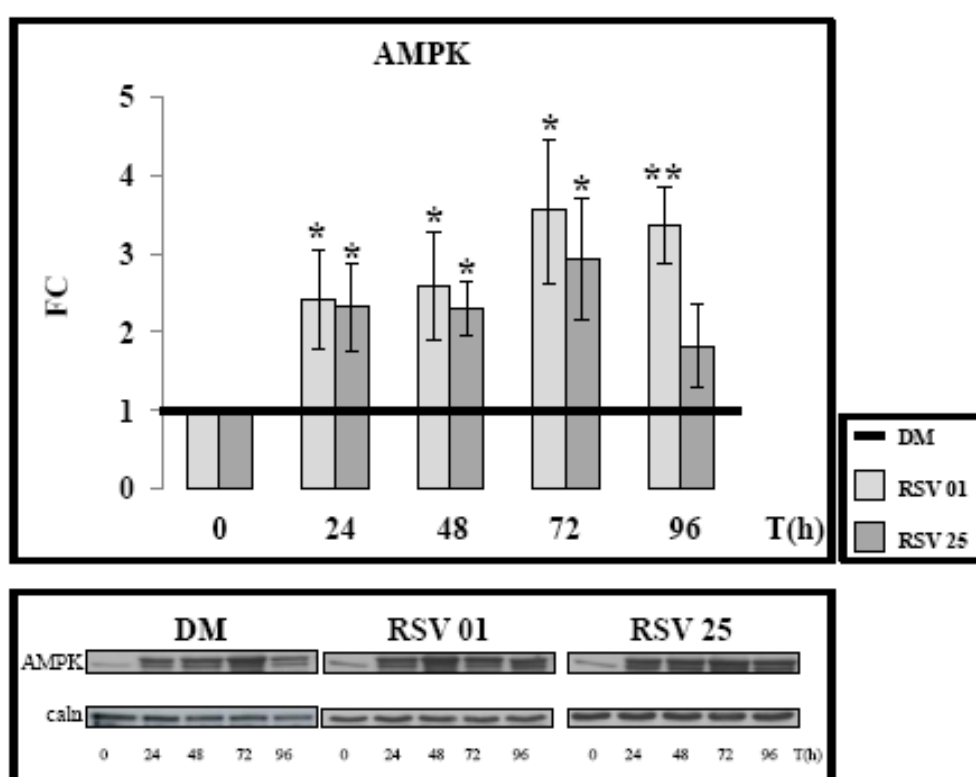


Figura 4.18 : *Livelli di espressione della proteina AMPK, fondamentale regolatore metabolico cellulare, durante il differenziamento, valutati mediante analisi di western blot. I dati sono presentati come incremento rispetto al controllo. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.*

In basso sono riportate le bande corrispondenti alle proteine analizzate.

Il ruolo fondamentale della proteina AMPK conferisce una rilevanza sostanziale a questo dato sperimentale: il resveratrolo, di fatto, potrebbe avere un effetto su questo regolatore chiave del metabolismo cellulare.

Nei processi metabolici cellulari, il fattore in precedenza descritto IGF-1 rappresenta il principale regolatore dei processi anabolici del muscolo scheletrico (*Figura 1.7*), e la sua attività biologica richiede il legame allo specifico recettore IGF-1R [101,120,221,222]. Questo recettore viene sintetizzato come singola catena polipeptidica (Pro IGF-1R) e subisce successivamente il processo di maturazione che porta alla sintesi del recettore attivo.

Lo studio quantitativo di espressione proteica ha evidenziato l'effetto positivo del resveratrolo sui livelli proteici di questo recettore chiave del metabolismo cellulare nelle cellule C2C12 trattate con questo polifenolo naturale, rispetto alle cellule non trattate durante tutte le fasi di differenziamento, come è possibile osservare in *Figura 4.19 e 4.20* (Pro IGF-1 R: RSV 0,1 μ M vs DM 24 h $p \leq 0,05$; 48 h $p \leq 0,05$; RSV 25 μ M vs DM 24 h $p \leq 0,05$) (IGF-1 R: RSV 0,1 μ M vs DM 24 h $p \leq 0,05$).

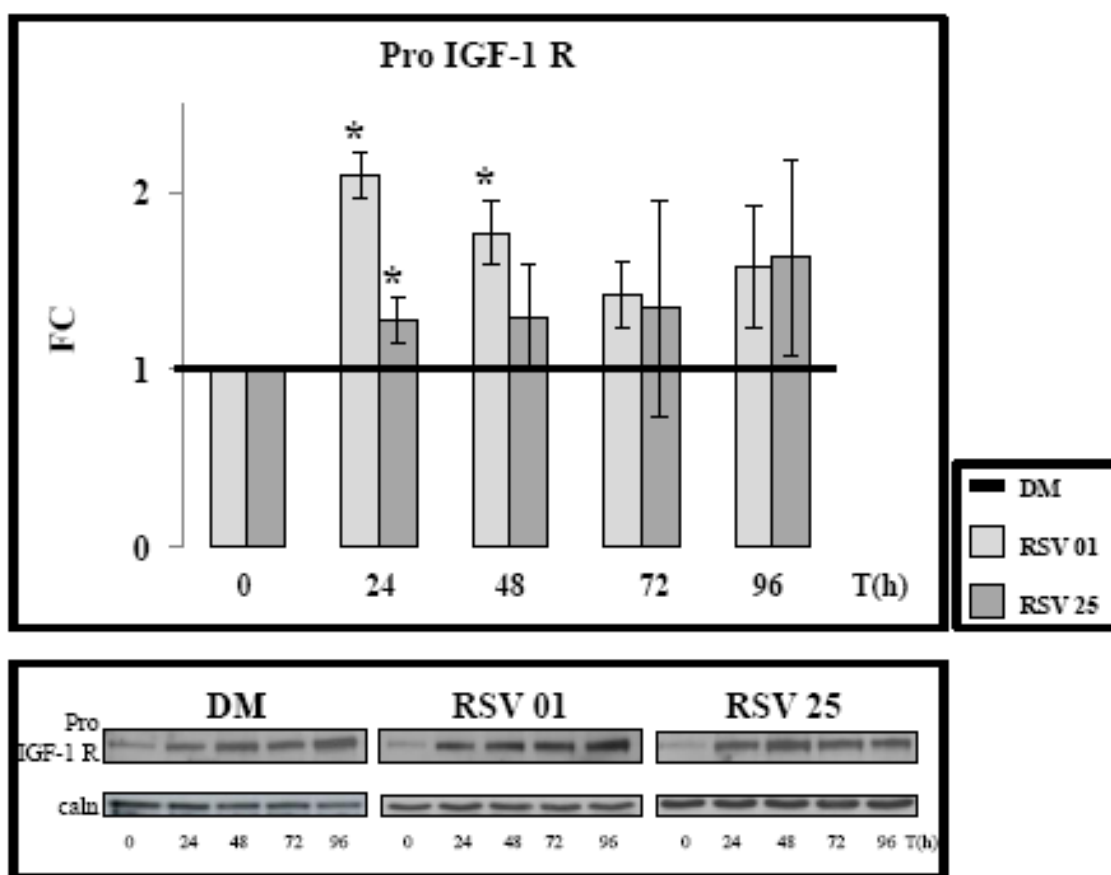


Figura 4.19 : *Livelli di espressione proteica del pro-recettore Pro IGF-1R durante il differenziamento, valutati mediante analisi di western blot. I dati sono presentati come incremento rispetto al controllo. * $p \leq 0,05$.*

In basso sono riportate le bande corrispondenti alle proteine analizzate.

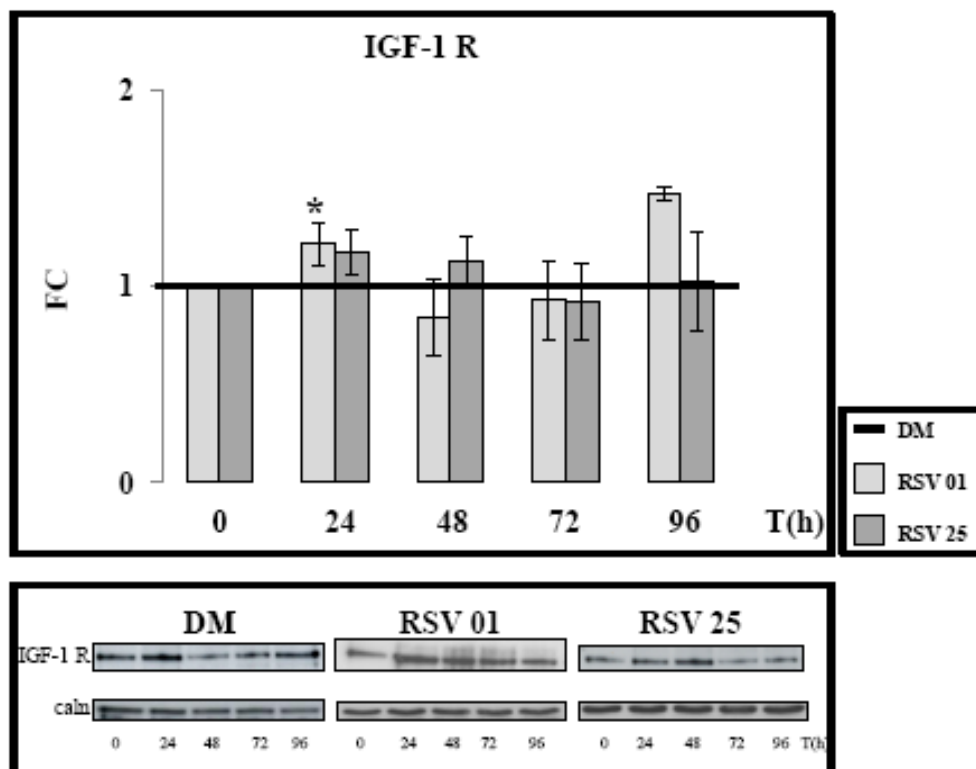


Figura 4.20 : *Livelli di espressione proteica del recettore IGF-1 durante il differenziamento, valutati mediante analisi di western blot. I dati sono presentati come incremento rispetto al controllo. * $p \leq 0,05$.*

In basso sono riportate le bande corrispondenti alle proteine analizzate.

E' nota in letteratura l'importanza della via di signaling delle MAP chinasi ERK 1 e ERK 2 nei processi di proliferazione e di inibizione da contatto [223,224,225].

I dati finora presentati, che descrivono una minore inibizione da contatto nelle cellule cresciute in presenza di resveratrolo, hanno portato ad ipotizzare un possibile ruolo di questo polifenolo nell'attivazione delle chinasi ERK 1 e ERK 2, mediante un aumento del grado di fosforilazione delle stesse.

Per questa ragione, è stata quindi effettuata, durante il differenziamento muscolare, una valutazione dei livelli di fosforilazione di ERK 1 e ERK 2 utilizzando gli anticorpi primari anti ERK 1/2 fosforilato.

Come è possibile osservare in *Figura 4.21*, le due dosi di resveratrolo somministrate alle C2C12 esercitano un'azione positiva nell'attivazione delle chinasi ERK 1 e ERK 2 (pERK 1: RSV 0,1 μ M vs DM 48 h, 72 h, 96 h $p \leq 0,05$; RSV 25 μ M vs DM 24 h, 48 h, 72 h, 96 h $p \leq 0,05$) (pERK 2: RSV 0,1 μ M vs DM 48 h, 72 h, 96 h $p \leq 0,05$; RSV 25 μ M vs DM 48 h, 72 h, 96 h $p \leq 0,05$).

E' descritto in letteratura il ruolo delle MAP chinasi ERK 1 e ERK 2 nella regolazione del processo di fusione cellulare e, in particolare, il coinvolgimento cruciale di ERK 2 nella completa maturazione dei miotubi di neo formazione [224].

In quest'ottica, i dati fino a qui presentati supportano ulteriormente l'ipotesi di un'azione positiva di questo polifenolo naturale nelle fasi terminali del differenziamento muscolo scheletrico.

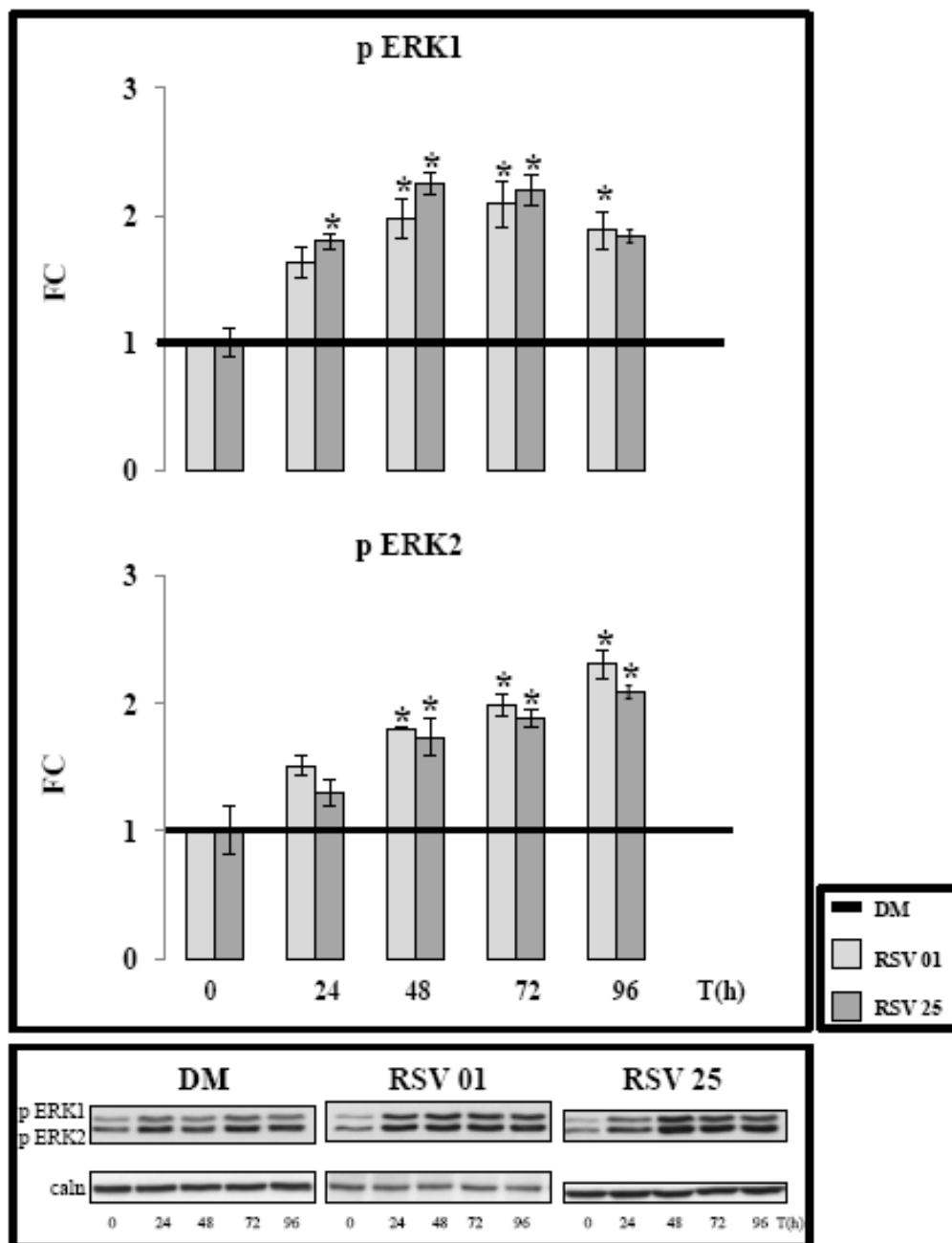


Figura 4.21 : *Livelli di espressione proteica di pERK 1 e pERK 2 durante il differenziamento, valutati mediante analisi di western blot. I dati sono presentati come incremento rispetto al controllo. * $p \leq 0,05$. In basso sono riportate le bande corrispondenti alle proteine analizzate.*

Lo studio delle fasi terminali del processo differenziativo ha, quindi, gettato le basi per l'analisi del processo conseguente alla fusione cellulare nelle cellule muscolari scheletriche: la genesi di ipertrofia.

4.4 STUDIO DEL PROCESSO IPERTROFICO

Allo scopo di delucidare il possibile effetto del resveratrolo nel processo ipertrofico, a seguito del completamento del processo differenziativo (dopo 72 ore dall'induzione), i miotubi di nuova formazione sono stati trattati con questo composto naturale (lo schema dei trattamenti è illustrato nella sezione Materiali e Metodi, *Figura 3.1*), ed è stata studiata l'espressione proteica di alcune proteine strutturali aventi un ruolo chiave nella genesi di ipertrofia cellulare.

Lo studio dei cambiamenti morfologici effettuato quotidianamente, anche nella fase di post-differenziamento, ha permesso di osservare la formazione dei centri di fusione dei miotubi neoformati, come si può chiaramente notare in *Figura 4.22*.

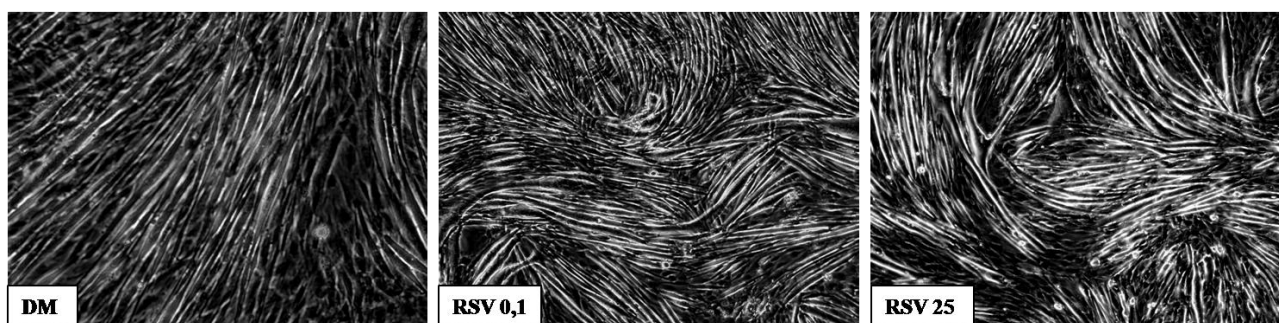


Figura 4.22 : *Morfologia cellulare dei neo-miotubi controllo e dei neo-miotubi trattati con resveratrolo 0,1 e 25 μ M dopo 72 ore di differenziamento. Fotografie al microscopio a contrasto di fase, ingrandimento 20x.*

Lo studio quantitativo del contenuto proteico di MyHC, mostrato in *Figura 4.23*, conferma quanto già osservato in precedenza: la stimolazione con resveratrolo induce considerevoli incrementi nei livelli di proteina rispetto al controllo, favorendo quindi lo sviluppo ulteriore dei miotubi (RSV 0,1 μ M vs DM 30 min, 4 h, 24 h $p \leq 0,05$; RSV 0,1 μ M vs DM 8 h $p \leq 0,01$; RSV 25 μ M vs DM 30 min, 4 h, 8 h, 24 h $p \leq 0,05$).

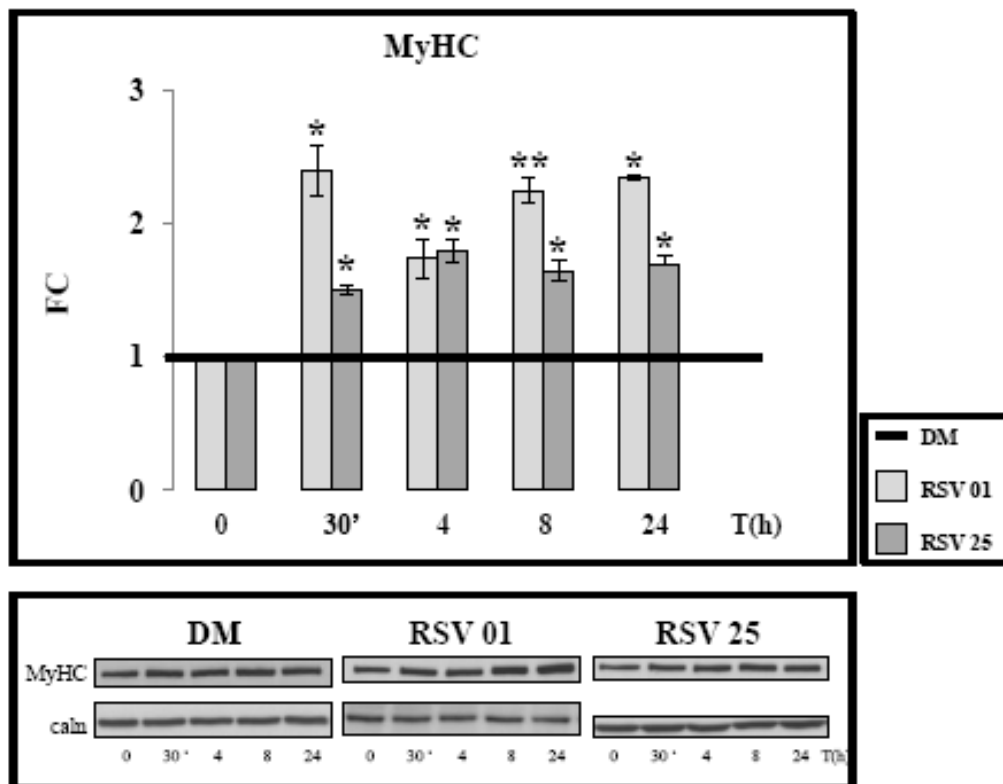


Figura 4.23 : *Livelli di espressione proteica di MyHC nella fase post-differenziativa, valutati mediante analisi di western blot. I dati sono presentati come incremento rispetto al controllo.*

** $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.*

In basso sono riportate le bande corrispondenti alle proteine analizzate.

Anche i livelli di N-Caderina risultano essere aumentati se rapportati alle cellule di controllo differenziativo (*Figura 4.24*) (RSV 0,1 μ M vs DM 30 min, 4 h $p \leq 0,01$; 8 h, 24 h $p \leq 0,05$; RSV 25 μ M vs DM 30 min $p \leq 0,01$; 4 h, 8 h, 24 h $p \leq 0,05$).

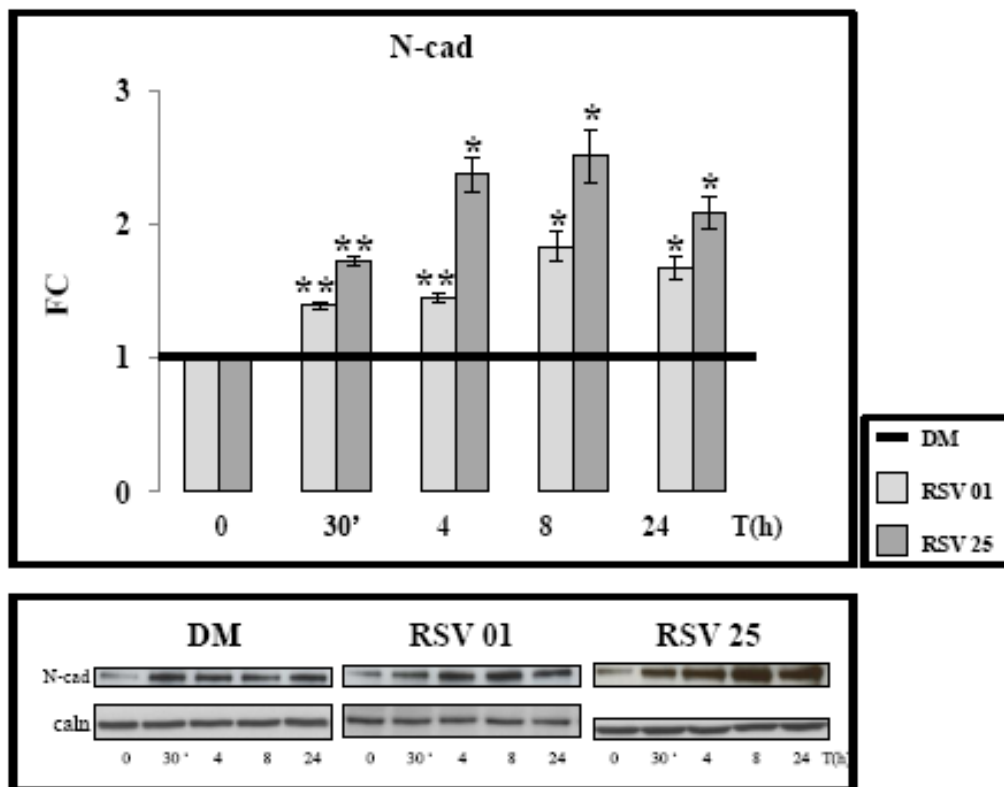


Figura 4.24 : *Livelli di espressione proteica di N-Caderina nella fase post-differenziativa, valutati mediante analisi di western blot. I dati sono presentati come incremento rispetto al controllo. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.*

In basso sono riportate le bande corrispondenti alle proteine analizzate.

Il resveratrolo, inoltre, incrementa significativamente il contenuto proteico di AMPK anche nella fase di post-differenziamento (*Figura 4.25*) (RSV 0,1 μ M vs DM 8 h $p \leq 0,01$; RSV 25 μ M vs DM 30 min, 4 h $p \leq 0,01$; RSV 25 μ M vs DM 24 h $p \leq 0,05$).

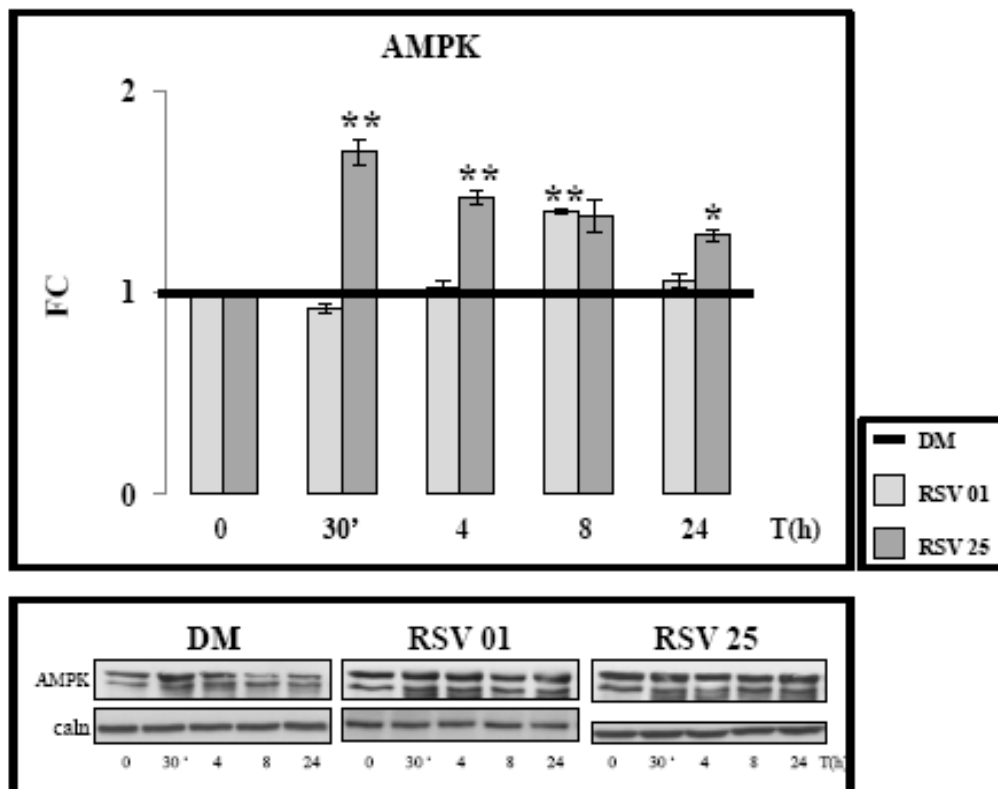


Figura 4.25 : *Livelli di espressione proteica del regolatore metabolico AMPK nella fase post-differenziativa, valutati mediante analisi di western blot. I dati sono presentati come incremento rispetto al controllo. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.*

In basso sono riportate le bande corrispondenti alle proteine analizzate.

Il fattore trascrizionale c-Jun ha una duplice funzione nella regolazione dell'omeostasi cellulare: in quanto può regolare sia la proliferazione che la morte cellulare.

AP-1 è un fattore di trascrizione che si trova in molti tipi cellulari, la cui attivazione necessita della fosforilazione della proteina c-Jun, già presente nel citoplasma, e della neosintesi della proteina Fos. La trascrizione e la sintesi di Fos sono stimulate dall'attivazione della via di ERK [226].

AP-1, regolatore della trascrizione cellulare, è stato investito di una notevole attenzione in questi ultimi anni, a seguito di evidenze in letteratura che descrivono un suo fondamentale ruolo nella regolazione della contrattilità di cellule muscolari lisce, mediante l'azione sulle proteine citoscheletriche Actina e Miosina, attraverso meccanismi ancora non completamente delucidati [227].

Lo studio dei livelli di espressione proteica di c-Jun, effettuato mediante saggi di western blot durante la fase post-differenziativa, ha permesso di valutare l'azione positiva del resveratrolo 25 μ M su questo componente dell'importante complesso trascrizionale AP-1 (*Figura 4.26*) (RSV 25 μ M vs DM 30 min $p \leq 0,01$; RSV 25 μ M vs DM 4 h, 8 h, 24 h $p \leq 0,05$).

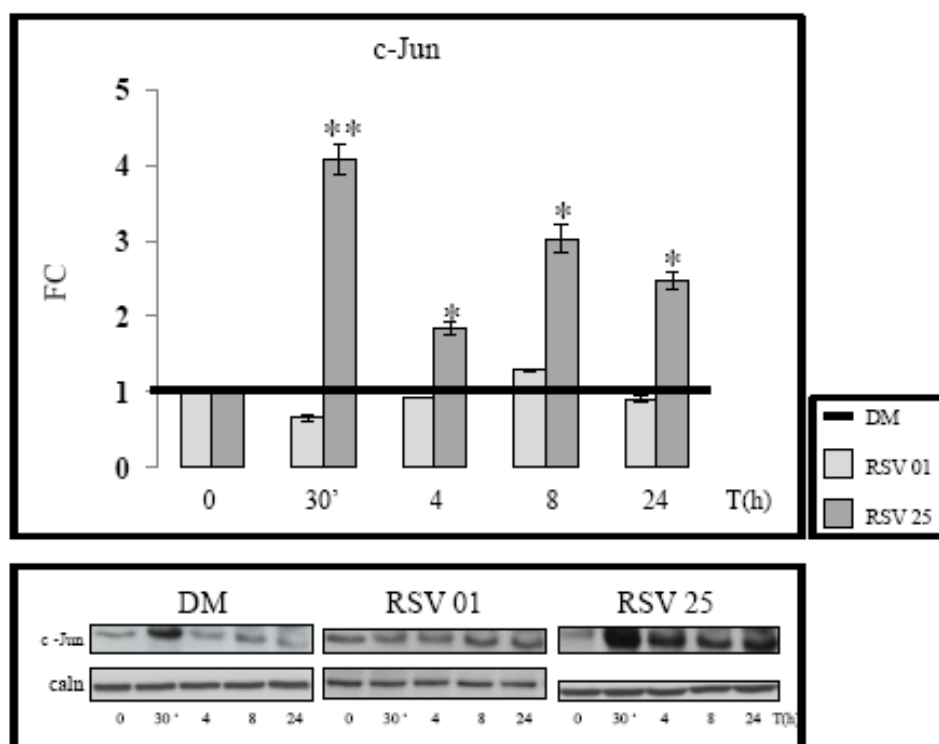


Figura 4.26 : *Livelli di espressione proteica del fattore di trascrizione c-Jun nella fase post-differenziativa, valutati mediante analisi di western blot. I dati sono presentati come incremento rispetto al controllo. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.*

In basso sono riportate le bande corrispondenti alle proteine analizzate.

Anche nella fase post-differenziativa, dopo 8 ore di trattamento, sono stati eseguiti saggi di immunofluorescenza indiretta con lo scopo di continuare a monitorare i cambiamenti morfologici osservati nelle fasi precedenti della miogenesi.

Nei miotubi di nuova formazione, è stata valutata l'espressione qualitativa delle basilari proteine muscolo scheletriche a funzione strutturale Miostatina e MyHC e della proteina p21.

Le immagini in fluorescenza in *Figura 4.27* e *4.28* mostrano un incremento considerevole delle dimensioni dei neo-formati miotubi.

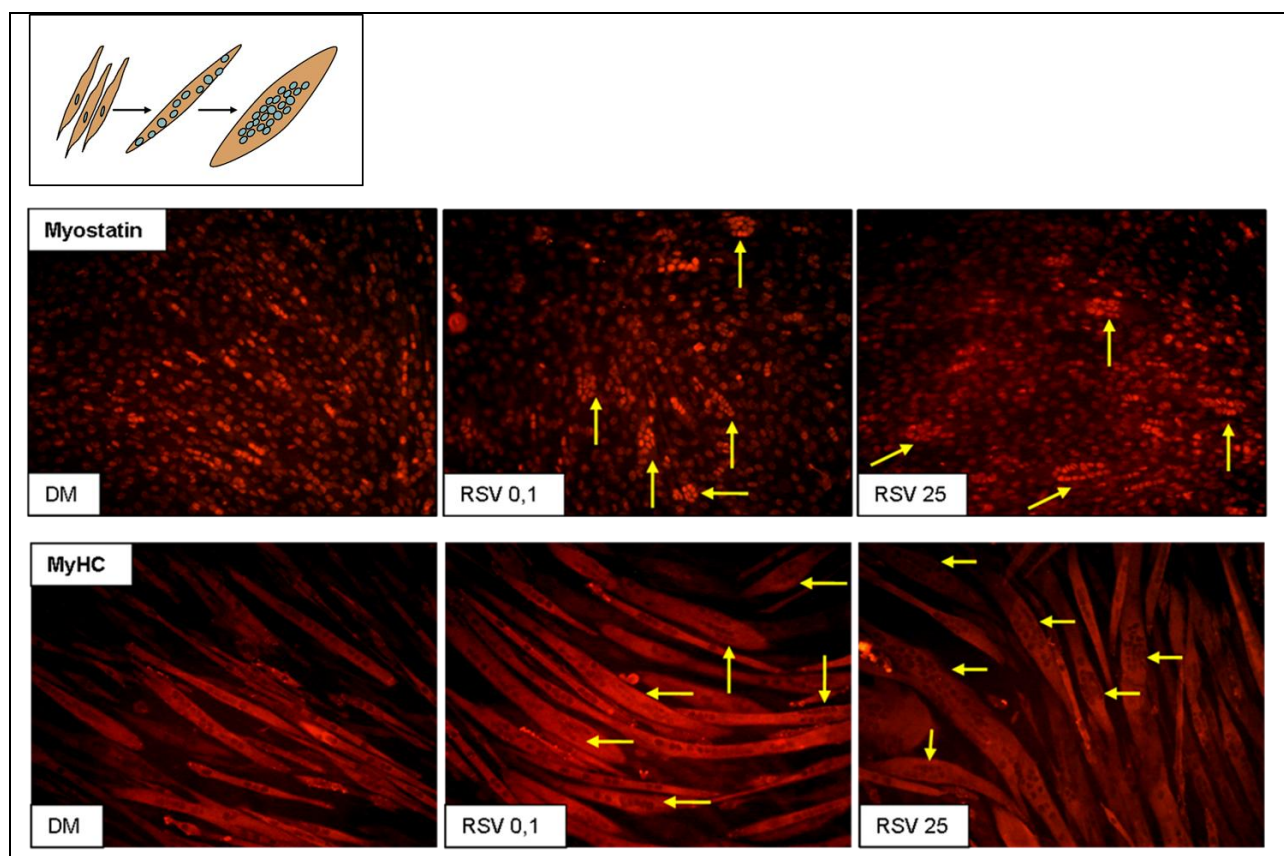


Figura 4.27 : *Immagini in immunofluorescenza con l'anticorpo Miostatina e MyHC collezionate nella fase di post-differenziamento (dopo 72 ore dall'induzione), 8 ore di trattamento con resveratrolo. Ingrandimento 20X. Le frecce di colore giallo indicano i nuclei all'interno dei miotubi di neoformazione.*

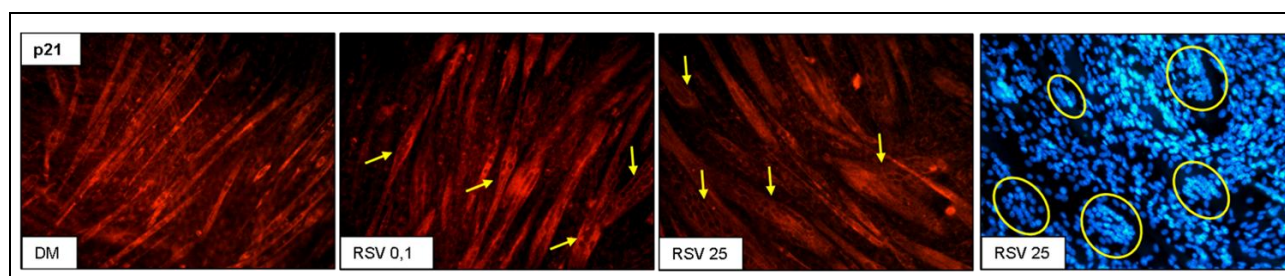


Figura 4.28 : *Immagini in immunofluorescenza con l'anticorpo p21, collezionate nella fase di post-differenziamento, 8 ore di trattamento con resveratrolo. Ingrandimento 20X. Le frecce di colore giallo indicano i nuclei all'interno dei miotubi di neoformazione. L'immagine in DAPI permette l'osservazione della disposizione nucleare all'interno del miotubo.*

Il movimento dei nuclei all'interno dei miotubi di nuova formazione nella fase post-differenziativa è stato studiato mediante saggi di immunofluorescenza indiretta usando anticorpi specifici contro le proteine Miostatina, MyHC e p21 e tramite la colorazione DAPI. L'analisi di queste proteine markers del differenziamento muscolo-scheletrico terminale [228,229,230,231] rappresenta un aspetto fondamentale nello studio della genesi di ipertrofia.

In letteratura [232,233] tale migrazione è accuratamente documentata e considerata un indice di ipertrofia cellulare: i nuclei, a seguito del processo di fusione, sono disposti all'interno del miotubo in posizione non determinata, non sono allineati e sono localizzati contro la membrana plasmatica. L'inizio del processo di ipertrofia invece regola la distribuzione nucleare in maniera precisa: i nuclei migrano nella zona centrale del miotubo e si dispongono in modo ordinato su più file parallele. Nel corso del processo ipertrofico è comune osservare caratteristiche disposizioni circolari dei nuclei, a formare anelli singoli o multipli all'interno dello stesso miotubo. La presenza di questi anelli circolari è un indicatore comprovato del fenomeno ipertrofico cellulare [232,233].

Infine, l'aumento nelle dimensioni nei miotubi neo-formati è stato quantificato mediante le misurazioni dei parametri di lunghezza e diametro, considerati indicativi in letteratura delle modificazioni morfologiche tipiche del processo ipertrofico [234,235,236].

Nei grafici in *Figura 4.29* sono illustrati i risultati di tali misurazioni. Sono stati considerati i miotubi MyHC positivi con un numero di nuclei ≥ 3 . In particolare, la determinazione del diametro è stata effettuata nel punto di massima larghezza.

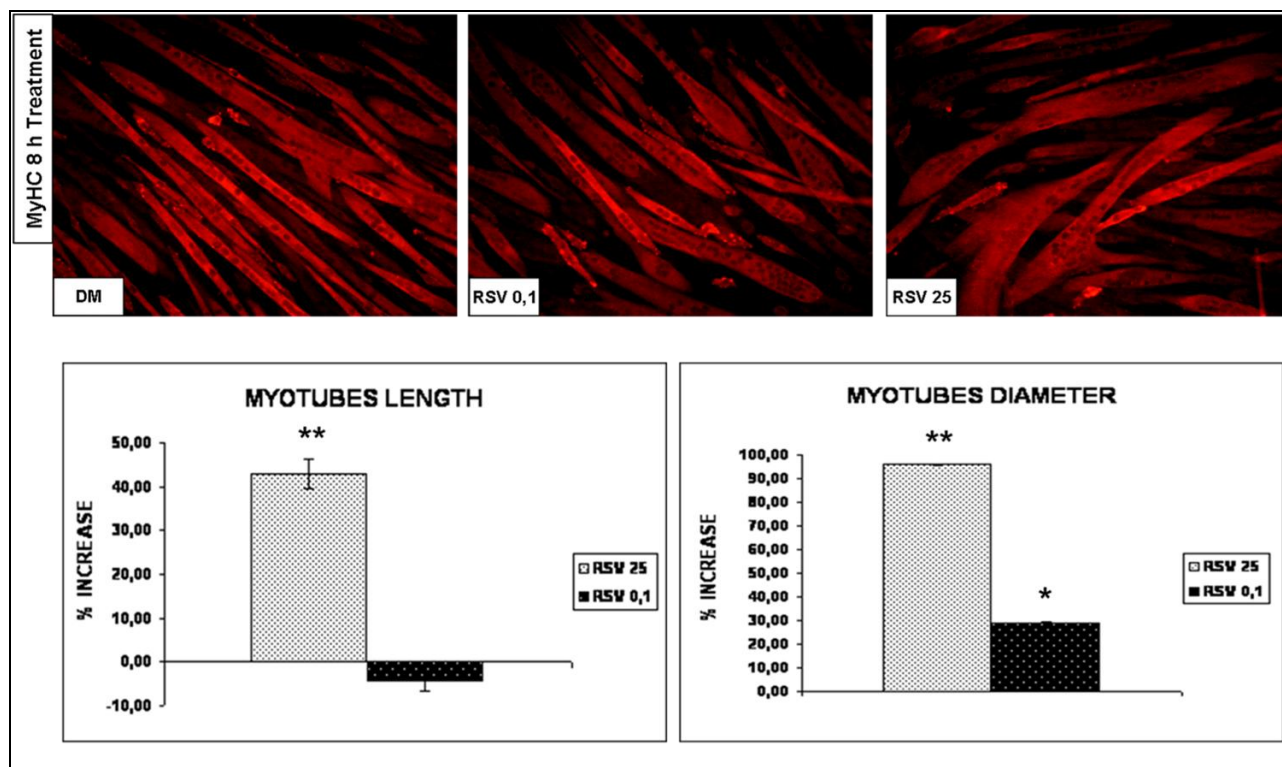


Figura 4.29 : Immagini aggiuntive in immunofluorescenza con l'anticorpo MyHC, collezionate nella fase di post-differenziamento, 8 ore di trattamento con resveratrolo. Ingrandimento 20X. I grafici mostrano gli incrementi percentuali rispetto al controllo dei parametri dimensionali lunghezza e diametro dei miotubi di nuova formazione.

Le dimensioni dei miotubi, formati a seguito del processo di fusione in cellule sottoposte a trattamento con resveratrolo, sono state confrontate con le dimensioni dei miotubi ottenuti nelle condizioni di controllo differenziativo.

I conteggi effettuati sulle immagini in immunofluorescenza per la proteina MyHC (Figura 4.29) hanno permesso di valutare gli incrementi statisticamente significativi nel parametro della lunghezza (RSV 25 μ M vs DM $p \leq 0,01$), e nel parametro del diametro dei miotubi (RSV 0,1 μ M vs DM $p \leq 0,05$; RSV 25 μ M vs DM $p \leq 0,01$).

L'incremento di questi parametri dimensionali e i cambiamenti morfologici dei miotubi neo-formati si possono considerare, quindi, valide prove sperimentali della genesi del fenomeno ipertrofico a seguito di trattamento con resveratrolo.

Infine, nella serie di immagini di seguito proposte, viene illustrato lo studio in immunofluorescenza indiretta per la valutazione qualitativa dell'espressione di ulteriori proteine analizzate nella fase post-differenziativa: AKT, N-Caderina, Catenina p120, p27 e p38alfa.

Lo studio morfologico, effettuato dopo 8 ore di trattamento sui miotubi di nuova formazione, ha apportato ulteriori conferme alle evidenze morfologiche fino a qui descritte.

In *Figura 4.30* è possibile osservare l'effetto del resveratrolo sulla lunghezza e il diametro nelle cellule trattate rispetto alle cellule di controllo DM colorate con l'anticorpo AKT, protein chinasi che svolge un ruolo chiave nel pathway PI3K/AKT (*Figura 1.7*).

L'incremento dei parametri dimensionali di lunghezza e diametro dei miotubi, quantificati mediante l'analisi in immunofluorescenza della proteina MyHC, è visibile anche nelle colorazioni con l'anticorpo N-Caderina, il cofattore funzionale Catenina p120 e la proteina inibitore delle chinasi ciclina-dipendenti (CKI) p27 (*Figura 4.31*, *Figura 4.32* e *Figura 4.33*).

L'immunofluorescenza per la Catenina p120 in *Figura 4.32* e per la proteina p38alfa in *Figura 4.34* evidenzia, altresì, la presenza di veri e propri centri di fusione, già in precedenza menzionati, indicativi dell'intensa attività di fusione dei miotubi neo-formati nelle condizioni sottoposte a trattamento con resveratrolo.

La colorazione con gli anticorpi AKT e p27 (*Figura 4.30* e *Figura 4.33*) ha confermato, inoltre, il prima citato movimento dei nuclei all'interno dei miotubi stimolati con le due dosi di resveratrolo.

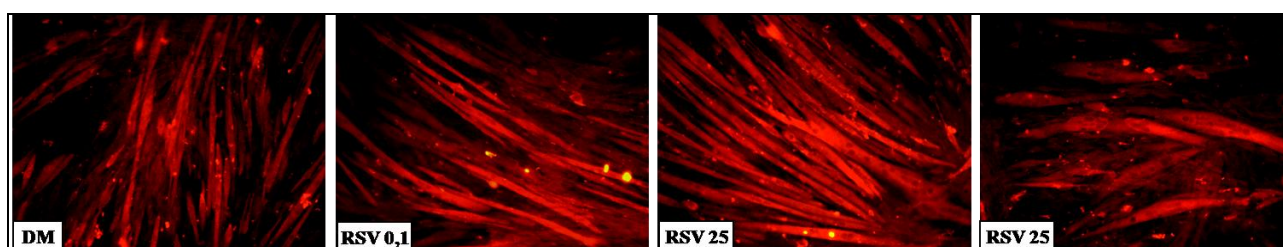


Figura 4.30 : *Immagini in immunofluorescenza con l'anticorpo AKT, collezionate nella fase di post-differenziamento, 8 ore di trattamento con resveratrolo. Ingrandimento 20X.*

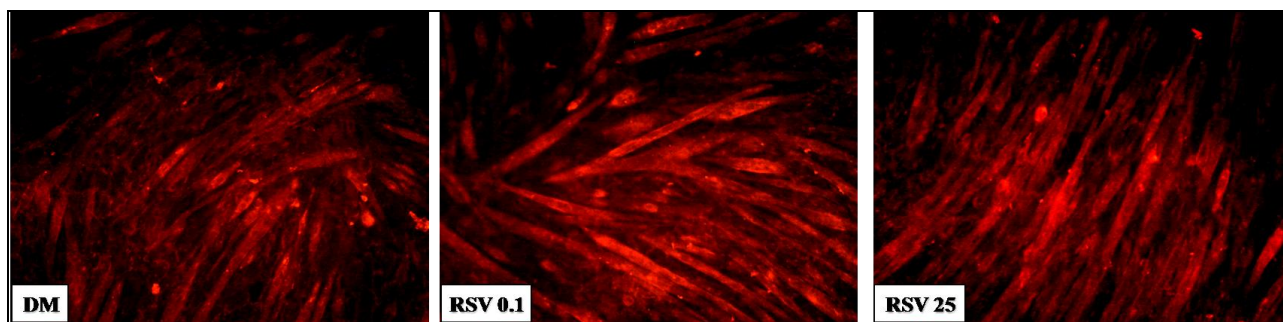


Figura 4.31 : Immagini in immunofluorescenza con l'anticorpo N-Caderina, collezionate nella fase di post-differenziamento, 8 ore di trattamento con resveratrolo. Ingrandimento 20X.

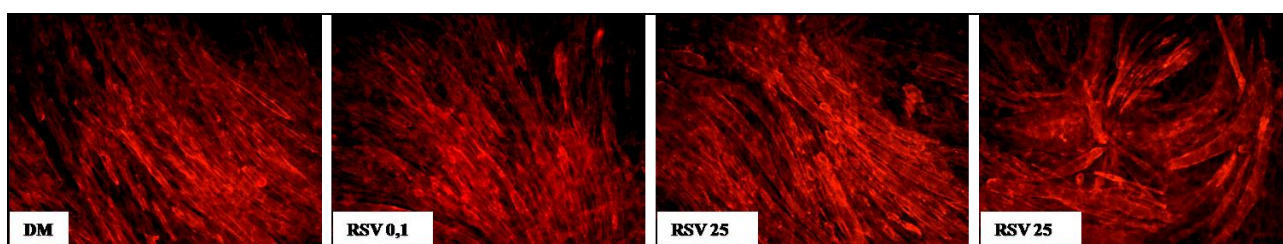


Figura 4.32 : Immagini in immunofluorescenza con l'anticorpo Catenina p120, collezionate nella fase di post-differenziamento, 8 ore di trattamento con resveratrolo. Ingrandimento 20X.

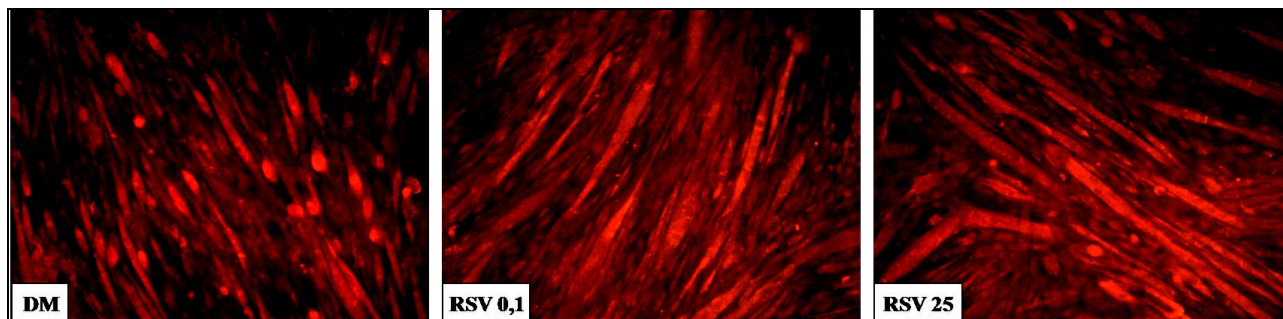


Figura 4.33 : Immagini in immunofluorescenza con l'anticorpo p27, collezionate nella fase di post-differenziamento, 8 ore di trattamento con resveratrolo. Ingrandimento 20X.

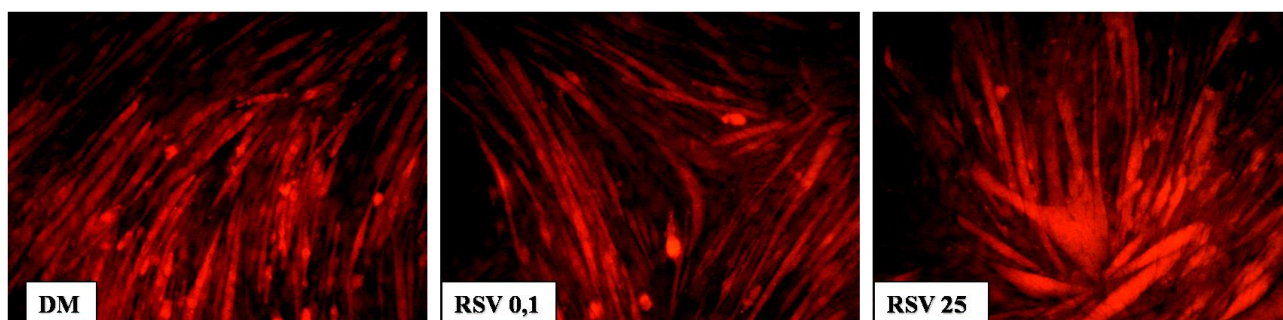


Figura 4.34 : Immagini in immunofluorescenza con l'anticorpo p38alfa, collezionate nella fase di post-differenziamento, 8 ore di trattamento con resveratrolo. Ingrandimento 20X.

5. DISCUSSIONE

Studi epidemiologici condotti nell'ultimo ventennio hanno evidenziato la stretta associazione esistente tra l'assunzione di determinati nutrienti e l'insorgenza nonché il grado di severità di numerose patologie croniche [1,2,9,10].

Un significativo numero di malattie legate allo stato nutrizionale quali obesità, sindrome metabolica, diabete mellito di tipo 2, patologie a carico dell'apparato cardiovascolare ed alcuni tipi di neoplasie, manifestano una base poligenica e multifattoriale, e la loro evoluzione e progressione risultano correlate a varianti geniche multiple e all'interazione con fattori ambientali quali appunto il regime alimentare [1,18,19,21,24,25,26,27,28,33].

Negli ultimi anni, sempre maggiori evidenze hanno descritto come i componenti biochimici, contenuti negli alimenti assunti con la dieta, possono agire in maniera diretta o indiretta sul controllo dell'espressione genica. Se si considera il metabolismo cellulare, i nutrienti possono fungere da ligandi per recettori di fattori di trascrizione, o ancora essere metabolizzati mediante pathways cellulari, alterando la concentrazione di substrati o intermedi metabolici, e regolando infine l'intera rete di signaling cellulari [2,9,11,13,14,19,36,37].

La Nutrigenomica si avvale dell'utilizzo di molteplici discipline, allo scopo di identificare gli effetti dei principali nutrienti sulla stabilità del genoma, su eventuali alterazioni dell'epigenoma, su modificazioni nell'espressione di DNA e mRNA, sull'espressione proteica e sullo studio dei metaboliti. Inoltre, questa disciplina permette di analizzare le possibili interazioni tra i sistemi biologici e le molecole nutritive, al fine di comprendere come queste ultime siano in grado di regolare lo stato di omeostasi cellulare [2,3,5,6,9,10,11,14,16,18].

Numerosi lavori in letteratura dell'ultimo decennio descrivono ampiamente gli effetti benefici del polifenolo Resveratrolo, fitoalessina investita di notevole interesse in campo medico, farmacologico e biologico grazie alle sue molteplici proprietà [163,164,165,166].

Tra le azioni più studiate di questo composto di origine naturale vi sono sicuramente le funzioni protettive svolte come agente antiossidante, antinfiammatorio, antiproliferativo e promotore dei processi di differenziamento. Questi effetti benefici sono stati esaminati, tra l'altro, in numerose patologie correlate alla senescenza cellulare, in patologie a carico dell'apparato cardiovascolare, in alcune forme di neoplasia, in malattie metaboliche e in patologie del sistema neurologico [163,164,174,176,177,180,183,185,189].

Nel sistema muscolo scheletrico, il resveratrolo sembra essere coinvolto in processi di regolazione del metabolismo cellulare, in particolare nel catabolismo proteico; inoltre è in grado di conferire resistenza verso gli effetti avversi causati dallo stress ossidativo e nella prevenzione del danno muscolare indotto dalla morte delle cellule muscolari scheletriche.

Non meno importante risulta essere l'evidenza che il resveratrolo sarebbe in grado di aumentare la resistenza alla fatica muscolare [202,203,207].

Solo negli ultimi anni, l'attenzione è stata focalizzata verso la comprensione del possibile ruolo svolto da questo polifenolo sul processo di miogenesi [237]; i meccanismi molecolari attraverso i quali è in grado di esercitare i suoi molteplici effetti benefici non sono però ancora del tutto delucidati e, ad oggi, sono oggetto di intenso studio.

La miogenesi è un processo strettamente regolato che si svolge in stadi successivi caratterizzati dall'espressione di specifiche proteine [65,66,67,71].

La trasformazione dei mioblasti in miociti è regolata da una famiglia di fattori di trascrizione denominati MRFs (Muscle Regulatory Factors), appartenenti alla superfamiglia dei fattori di trascrizione basici che interagiscono con il DNA mediante i domini bHLH (helix-loop-helix) e dai loro fattori di regolazione [71,72,73,75,76].

Una volta indotti a differenziare, i mioblasti escono dal ciclo cellulare arrestandosi in uno stato di quiescenza in fase G0/G1, nel quale cominciano ad esprimere geni muscolo-specifici; ha quindi inizio il processo di fusione che conduce alla formazione dei miotubi [79,81,106,238,239].

Durante questo processo le membrane cellulari e le proteine strutturali citoscheletriche svolgono un ruolo fondamentale nella comunicazione, nelle interazioni cellula-cellula e nella fusione. [209,214,215,216,219,220].

Lo scopo di questo lavoro di ricerca in vitro è stato quello di esaminare l'azione del resveratrolo, somministrato in due differenti dosi, sul modello cellulare di mioblasti murini immortalizzati, la linea C2C12 [73,208,209].

Il ruolo di questo polifenolo è stato studiato inizialmente nella fase proliferativa, quindi nella successiva fase di induzione del processo di differenziamento e nei seguenti stadi di progressione e completamento del processo stesso. Infine, a differenziamento ormai terminato, si è voluta analizzare la fase post-differenziativa con l'intento di valutare la genesi di ipertrofia.

Nello studio della fase proliferativa, sono state determinate le cinetiche di crescita dei mioblasti C2C12 sottoposti a trattamento con resveratrolo, confrontate con le cinetiche di crescita delle cellule di controllo proliferativo e differenziativo. L'analisi della capacità proliferativa ha permesso di osservare l'azione del polifenolo nel ridurre il numero di divisioni mitotiche, inducendo presumibilmente un arresto nel ciclo cellulare (*Figura 4.2*). A comprova di ciò, saggi di vitalità, eseguiti nel corso della realizzazione delle curve di crescita, hanno mostrato la totale assenza di mortalità cellulare.

In supporto a queste evidenze, è stato effettuato uno studio morfologico quotidiano allo scopo di monitorare eventuali modificazioni indotte dal trattamento.

L'analisi morfologica ha permesso di osservare alcuni cambiamenti nelle cellule sottoposte a stimolo con questo polifenolo rispetto alle cellule di controllo: il resveratrolo sembra causare nei mioblasti la perdita della caratteristica forma tondeggiante, tipica dello stato di attiva proliferazione, in favore dell'acquisizione di una morfologia più allungata. Questo aspetto morfologico è peculiare del fenotipo muscolare.

Come è noto, l'attivazione del programma di differenziamento muscolare richiede l'uscita irreversibile delle cellule dal ciclo cellulare e l'espressione di geni tessuto-specifici [65,66,67,70,79,106].

Partendo da questo presupposto, si è proceduto con l'analisi degli effetti delle due differenti dosi di resveratrolo sui principali regolatori del ciclo cellulare: le cicline e le relative chinasi ciclina-dipendenti. Come è noto in letteratura, l'espressione della maggior parte delle cicline, implicate nei processi di regolazione del ciclo, decresce sensibilmente con l'induzione del processo differenziativo, quando le cellule risultano ferme nella fase G1 [65,79,106,108,110].

I dati ottenuti rispecchiano perfettamente questo andamento, come si può osservare dai livelli di mRNA riscontrati nell'analisi in Real-Time-PCR: il trattamento con resveratrolo induce una rilevante down-regolazione nei livelli di espressione genica delle principali cicline (*Figura 4.4*).

L'espressione del fattore di regolazione principe, p21, è un evento chiave nell'uscita dal ciclo di replicazione cellulare e nell'induzione del differenziamento [70,71,108,109,110].

I livelli di p21 nelle cellule trattate (GM+RSV) risultano perfettamente sovrapponibili ai livelli riscontrati nelle cellule del controllo differenziativo (DM), facendo supporre che in queste due condizioni l'induzione del processo di differenziamento proceda con velocità simili, sicuramente più rapidamente rispetto a quanto si verifica nelle cellule di controllo proliferativo (GM), in cui il contenuto proteico di p21 risulta maggiore (*Figura 4.5*).

Con l'intento di ottenere ulteriori conferme della sopraindicata ipotesi, si è proceduto con lo studio dell'espressione proteica di Myf-5 e MyoD, considerati i due marker di differenziamento precoce, la cui espressione si può determinare già nei mioblasti indifferenziati e ancora proliferanti. Il resveratrolo induce un incremento nei livelli di questi due fattori di regolazione (*Figura 4.5* e *Figura 4.6*).

Infine, lo studio morfologico effettuato sulle cellule nel corso della fase proliferativa (24,48 e 72 ore) ha confermato le differenze nella forma e nelle dimensioni cellulari a seguito del trattamento, rispetto alla morfologia osservata nelle cellule controllo (*Figura 4.6*, *Figura 4.7* e *Figura 4.8*).

Le evidenze sperimentali sino a qui descritte rappresentano prove valide a supporto dell'ipotesi formulata inizialmente sul potenziale ruolo del resveratrolo nella regolazione delle fasi del ciclo cellulare, nell'arresto della proliferazione e, conseguentemente, nella promozione dell'inizio del processo di differenziamento.

L'azione di questo polifenolo sulla regolazione del ciclo cellulare, già descritta in letteratura, è alla base di importanti lavori che propongono la possibilità di impiego del resveratrolo nella terapia delle complicanze di alcune forme tumorali [183]. In quest'ottica risulta quindi di estremo interesse lo studio, anche in vivo, dei meccanismi attraverso i quali il resveratrolo potrebbe essere in grado di svolgere non solo un'azione antitumorale, ma anche di prevenire i danni a carico del sistema muscolare, quali atrofia e cachessia neoplastica [240], e gli effetti collaterali indotti dalla chemioterapia.

E' stato ampiamente descritto nella sezione introduttiva di questo elaborato il ruolo fondamentale dei fattori di regolazione miogenica nel differenziamento muscolare. Tra le più recenti evidenze in letteratura [241,242] sono descritte le azioni indispensabili di MyoD e Miogenina per il corretto completamento del processo differenziativo. Gli effetti del resveratrolo descritti in questo lavoro sulla sintesi dei MRFs offrono un sostanziale punto di partenza per ulteriori promettenti sperimentazioni in vivo, allo scopo di ipotizzare l'impiego di questo polifenolo in condizioni patologiche caratterizzate da alterata espressione e sintesi di questi importanti regolatori.

I MRFs sono direttamente coinvolti, anche, nei fenomeni di rigenerazione muscolare, ad esempio nell'attivazione delle cellule satelliti [243], e ciò conferisce un'ulteriore rilevanza alla capacità del resveratrolo di promuovere la loro espressione e sintesi proteica.

Lo studio del differenziamento ha mostrato come il resveratrolo manifesti la capacità di promuovere il processo: dall'iniziale acquisizione del caratteristico fenotipo miogenico, inducendo e regolando l'espressione dei fattori di regolazione precoci, alla sintesi delle proteine marker di differenziamento terminale, alla riorganizzazione citoscheletrica (*Figura 4.13, Figura 4.14*).

L'azione di questo polifenolo sulle principali proteine citoscheletriche cellulari (*Figura 4.15, Figura 4.16, Figura 4.17*) assume un'importanza notevole se si pensa ad un suo potenziale impiego nella terapia di patologie del sistema muscolare, caratterizzate da difetti di riorganizzazione del compartimento citoscheletrico, come ad esempio nelle miopatie primarie e, in particolare, nelle distrofie muscolari [214,219,220,244,245,246].

Un'azione importante di questo polifenolo è stata verificata anche nella genesi di ipertrofia, come testimoniano i cambiamenti morfologici, gli incrementi dimensionali, la maggiore efficienza del processo di fusione e la migrazione dei nuclei che conduce alla formazione dei miotubi multinucleati e ipertrofici (*Figura 4.27, Figura 4.28, Figura 4.29*).

Alcuni suggeriscono come l'alto indice di fusione potrebbe essere espressione semplicemente della presenza di un maggiore numero di cellule che possono fondere tra loro, ma non è questa la situazione riscontrata in questo lavoro. Infatti, l'analisi della fase proliferativa e la colorazione in DAPI hanno dimostrato come il resveratrolo possa regolare negativamente la replicazione cellulare, favorendo l'arresto del ciclo e promuovendo l'induzione precoce del processo differenziativo.

E' di notevole importanza sottolineare, come nei miotubi formati a seguito di stimolazione con resveratrolo, la disposizione dei nuclei sia particolare: essi non sono allineati e localizzati in periferia contro la membrana plasmatica, ma sono raggruppati al centro del miotubo, una disposizione analoga a quella che si osserva nei miotubi quando si ha rigenerazione muscolare [232].

Un'ulteriore fondamentale evidenza è rappresentata dall'azione del resveratrolo sull'attivazione di ERK. Queste proteine sono coinvolte anche nel fenomeno di inibizione da contatto [223,224,225], oltre che nel differenziamento terminale e nello sviluppo di ipertrofia nei miotubi [222] (*Figura 4.21*). L'azione positiva del resveratrolo nell'attivazione di queste chinasi apre nuove prospettive di sperimentazioni in vivo, mirate all'analisi delle vie di signaling di sintesi proteica e genesi di ipertrofia muscolare scheletrica.

La rilevanza sperimentale di più grande interesse nello sviluppo di ipertrofia è però da attribuire all'importante effetto del resveratrolo nell'attivazione della via di signaling di IGF-1 (*Figura 4.19*, *Figura 4.20*). Innumerevoli lavori, anche molto recenti, presenti in letteratura delucidano ampiamente il ruolo di questo fattore nella genesi di ipertrofia [247,248]. Il resveratrolo quindi potrebbe regolare positivamente le vie di sintesi del metabolismo proteico cellulare.

In questi ultimi anni sta assumendo notevole importanza lo studio della relazione tra le vie di signaling mediate da IGF-1 ed i processi di atrofia muscolare [249,250,251]. In questi lavori IGF-1 sembrerebbe essere in grado di prevenire la genesi di atrofia e sarcopenia muscolare mediante l'azione di regolazione negativa sui principali "Atrogeni" (Atrogin-1 e MuRF-1), regolatori fondamentali dei processi di degradazione proteica ubiquitina-mediati nel muscolo scheletrico.

Alamdari N., in un suo recentissimo lavoro [252], descrive il ruolo, valutato in miotubi posti in coltura, del resveratrolo nell'inibizione della sintesi dei suddetti atrogeni attraverso un meccanismo mediato da SIRT-1.

Queste preliminari evidenze suggeriscono un ruolo rilevante di questo polifenolo, già ampiamente studiato nei fenomeni di invecchiamento cellulare proprio alla luce della sua azione sulle sirtuine, anche nei processi di senescenza ed atrofia nel muscolo scheletrico.

Oltre all'effetto del resveratrolo sul processo di miogenesi e ipertrofia, di fondamentale importanza risulta essere l'azione di questa fitoalessina sulla regolazione di alcune proteine chiave nei principali processi cellulari, quali la via di signaling di AMPK [253,254]. Il potenziale controllo esercitato da questo composto naturale sul principale sensore del metabolismo energetico cellulare (*Figura 4.18 e Figura 4.25*), rappresenta una base di partenza per un ipotetico suo impiego nella terapia delle complicanze a carico del muscolo scheletrico, caratteristiche della sindrome metabolica e del diabete. In queste patologie il resveratrolo potrebbe svolgere una duplice azione benefica non solo a livello muscolare, ma anche nella rigenerazione pancreatica, nella prevenzione delle complicanze vascolari e nell'inibizione dell'adipogenesi [254,255,256].

I dati preliminari discussi in questo lavoro suscitano quindi notevole interesse, in quanto il coinvolgimento del resveratrolo nei processi di induzione del differenziamento muscolo scheletrico, la capacità di generare ipertrofia cellulare, l'attivo controllo del metabolismo energetico cellulare, possono rappresentare un buon punto di partenza per ulteriori sperimentazioni in vivo, con l'obiettivo di cercare diverse possibilità di impiego terapeutico di questa fitoalessina naturale in condizioni di danno muscolare, di ipotrofia, atrofia e sarcopenia, a seguito di traumi e perdita di funzionalità metabolica delle cellule muscolari.

Inoltre, crescente interesse stanno avendo gli studi degli effetti del resveratrolo sui fenomeni di senescenza muscolare [257,258,259], allo scopo di proporre potenziali trattamenti volti a rallentare i processi di aging cellulare e perdita della funzionalità muscolare.

Oltre alle potenzialità di impiego terapeutico, è stato suggerito un possibile uso del resveratrolo come integratore alimentare. Infatti, sono già presenti in commercio numerose tipologie di integratori alimentari a base di questo polifenolo (e.g. www.revidox.it; www.biotivia.it), sviluppati sulla base dell'azione antiossidante e antinvecchiamento di questo composto naturale.

Ad oggi però, ancora poca rilevanza si conferisce al possibile impiego del resveratrolo sul sistema muscolo scheletrico come integratore alimentare nell'attività fisica di alta intensità.

Ricordando uno dei più conosciuti effetti benefici di questo polifenolo [163], l'azione antiossidante e di riduzione dei livelli di ROS cellulari, può essere interessante ipotizzare un suo potenziale impiego nella riparazione dei danni muscolari a livello strutturale o nel metabolismo energetico, che spesso si verificano in soggetti che praticano intensa attività fisica [260].

L'azione scavenger del resveratrolo potrebbe contrastare, infatti, i fenomeni di stress ossidativo cellulare, aggravati dall'esercizio fisico, e incrementare così la risposta muscolare in termini di aumentate performance ma, soprattutto, riducendo il rischio di danno muscolare causato da accumulo di radicali liberi dell'ossigeno [261]. A supporto di ciò, recentissimi lavori pubblicati hanno sottolineato come il resveratrolo possa aumentare la performance atletica promuovendo la biogenesi mitocondriale attraverso l'attivazione della via di signaling di AMPK [262].

In letteratura sono già presenti studi preliminari disegnati partendo da questo presupposto [263].

Alla base delle potenzialità di impiego del resveratrolo come agente terapeutico e/o integratore alimentare, sarà però fondamentale condurre ulteriori studi finalizzati a comprendere meglio le sue caratteristiche farmacocinetiche. Infatti, è importante ricordare come questo polifenolo presenti un'emivita molto breve, sia chimicamente instabile e non manifesti una spiccata solubilità in acqua. [264,265,266].

Con l'intento di trovare una risposta a questi problemi, sono stati condotti alcuni studi preliminari volti da un lato ad individuare modalità di assunzione in grado di massimizzare la biodisponibilità di questo composto, e dall'altro a sviluppare alcune molecole di sintesi derivate dal resveratrolo [267,268].

Queste peculiari caratteristiche chimico-fisiche del resveratrolo costituiscono il punto di partenza di alcuni lavori sperimentali che suggeriscono come alcune proprietà benefiche del polifenolo in esame siano state sovrastimate. Gli autori di questi studi sottolineano come gli effetti del resveratrolo siano estremamente correlati alla dose di somministrazione [269]. Partendo da queste considerazioni, in questo lavoro sono state utilizzate due diverse dosi di resveratrolo scelte tra le più basse concentrazioni efficaci, come illustrato nella sezione Risultati.

In conclusione, vista la sempre maggiore necessità di integrare un corretto regime alimentare con la costante pratica di esercizio fisico per il mantenimento di un buono stato di salute, il resveratrolo potrebbe essere introdotto come adiuvante sia nella terapia di patologie muscolari primarie e secondarie, sia nella preparazione atletica come vero e proprio integratore alimentare di origine naturale, in grado di promuovere lo sviluppo muscolare, eventuali processi di riparazione di danno muscolare e rigenerazione e la genesi di ipertrofia.

BIBLIOGRAFIA

-
- [1] Shils ME, Shike M, Ross A.C, Caballero B, J-Cousins R. **“Modern nutrition in Health and Disease”**. 2006. *10th ed. lippincott Williams A wolters Kluwer Company. Philadelphia*.chapetr: 39.
- [2] Ferguson LR. **“Nutrigenomics approaches to functional foods”**. 2009. *J Am Diet Assoc. 109(3):452-8*.
- [3] Subbiah MT. **“Nutrigenetics and nutraceuticals: the next wave riding on personalized medicine”**. 2007. *Transl Res. 149(2): 55-61*.
- [4] Neiberghs HL, Johnson KA. **“Alpharma Beef Cattle Nutrition Symposium: nutrition and the genome”**. 2012. *J Anim Sci. 90(7):2308-16*.
- [5] Bull C, Fenech M. **“Genome health nutrigenomics and nutrigenetics: nutritional requirements for chromosomal stability and telomere maintenance at the individual level”**. 2008. *Proc Nutr Soc. 67(2):146-56*.
- [6] Farhud D, Zarif Yeganeh M, Zarif Yeganeh M. **“Nutrigenomics and nutrigenetics”**. 2010. *Iran J Public Health. 39(4):1-14*.
- [7] El-Sohemy A. **“Nutrigenetics”**. 2007. *Forum Nutr. 60: 25-30*.
- [8] Dolinoy DC, Jirtle RL. **“Environmental epigenetics in human health”**. 2008. *Environ Mol Mutagen. 49(1):4-8*.
- [9] Paoloni-Giacobino A, Grimble R, Pichard C. **“Genetics and nutrition”**. 2003. *Clin Nutr. 22(5):429-35*.
- [10] Trujillo E, Davis C, Milner J. **“Nutrigenomics, Proteomics, Metabolomics and the Practice of Dietetics”**. 2006. *J Am Diet Assoc. 106(3):403-13*.
- [11] Ferguson LR. **“Nutrigenomics: integrating genomics approaches into nutrition research”**. 2006. *Mol Diag Ther. 10(2): 101-8*.
- [12] Kaptur J, Raymond LR. **“Nutritional genomics: the next frontier in the Post genomic era”**. 2004. *Physiol Genomics. 16:167-77*.
- [13] Milner J.A. **“Molecular Targets for Bioactive Food Components”**. 2004. *J Nutr. 134(9): 2492S-2498S*.
- [14] Ordovas JM, Corella D. **“Nutritional genomics”**. 2004. *Annu Rev Genomics Hum Genet. 5:71-118*.
- [15] Simopoulos AP. **“Genetic variants in the metabolism of omega-6 and omega-3 fatty acids: their role in the determination of nutritional requirements and chronic disease risk”**. 2010. *Exp Biol Med (Maywood). 235(7):785-95*.
- [16] Mutch DM., Wahli W., Williamson G. **“Nutrigenomics and nutrigenetics: the emerging faces of nutrition”**. 2005. *FASEB J. 19(12):1602-16*.
-

- [17] Ames BN, Elson-Schwab I, Silver EA. **“High-dose vitamin therapy stimulates variant enzymes with decreased coenzyme binding affinity (increased K(m)): relevance to genetic disease and polymorphisms”**. 2002. *Am J Clin Nutr.* 75(4):616-58.
- [18] Palou A. **“From nutrigenomics to personalized nutrition”**. 2007. *Genes Nutr.* 2 (1):5-7.
- [19] El-Sohemy A. **“The science of nutrigenomics”**. 2008. *Health Law Review.* 16(3):5-8.
- [20] Stover Patrick J. **“Nutritional genomics”**. 2004. *Physiol Genomics.* 16(2):161-5.
- [21] Virgili F, Perozzi G. **“How does Nutrigenomics Impact Human Health?”** 2008. *IUBMB Life.* 60(5):341-4.
- [22] Stover Patrick J. **“Influence of human genetic variation on nutritional requirements”**. 2006. *Am J Clin Nutr.* 83(2): 436S-42S.
- [23] Clarke SD. **“Nutrient regulation of gene and protein expression”**. 1999. *Curr opin Clin Nutr Metab care.* 2(4):287-9.
- [24] Ordovas JM. **“Nutrigenetics, Plasma Lipids and Cardiovascular Risk”**. 2006. *J Am Diet Assoc.* 106(7): 1074-81.
- [25] Ordovas JM. **“Genetic interactions with diet influence the risk of cardiovascular disease”**. 2006. *Am J Clin Nutr.* 83(2):443S-446S.
- [26] Willet W. **“Isocaloric diets are of primary interest in experimental and epidemiological Studies”**. 2002. *Int J EPidemiol.* 31(3):694-5.
- [27] Iacoviello L, Santimone I, Latella MC, De Gaetano G, Donati MB. **“Nutrigenomics: a case for the common soil between cardiovascular disease and cancer”**. 2008. *Genes Nutr.* 3(1): 19-24.
- [28] Kaput J, Dawson K. **“Complexity of type 2 diabetes mellitus data sets emerging from nutrigenomic research: a case for dimensionality reduction?”**. 2007. *Mutat Res.* 622(1-2):19-32.
- [29] Dauncey MJ, White P, Burton KA, Katsumata M. **“Nutrition hormone receptor-gene interactions: implications for development and disease”**. 2001. *Proc Nutr Soc.* 60(1):63-72.
- [30] Jacobs MN, Lewis DF. **“Steroid hormone receptors and dietary ligands: a selected review”**. 2002. *Proc Nutr Soc.* 61(1):105-22.
- [31] Lin SJ, Guarentel. **“Nicotinamide adenine dinucleotid, a metabolic regulator of transcription, longevity and disease”**. 2003. *Curr Opin Cell Biol.* 15(2): 241-6.
- [32] Miggiano GA, De Sanctis R. **“Nutritional genomics: toward a personalized diet”**. 2006. *Clin Ter.* 157(4): 355-61.
- [33] Stover PJ, Caudill MA. **“Genetic and Epigenetic Contributions to Human Nutrition and Health: Managing Genome-Diet Interactions”**. 2008. *J Am Diet Assoc.* 108(9):1480-7.

- [34] Davis CD, Uthus EO. **“DNA methylation, cancer susceptibility and nutrient interactions”**. 2004. *Exp Biol Med*. 229: 988-995.
- [35] Fenech M. **“The Genome Health Clinic diagnosis and nutritional treatment of genome and epigenome damage on an individual basis”**. 2005. *Mutagenesis*. 20(4):255-69.
- [36] Fenech M. **“Nutrition and genome health”**. 2007. *Forum Nutr*. 60:49-65.
- [37] Afman L, Muller M. **“Nutrigenomics: From Molecular Nutrition to Prevention of Disease”**. 2006. *J Am Diet Assoc*. 106(4):569-76.
- [38] Willet WC. **“Balancing life-style and genomics research for disease prevention”**. 2002. *Science*. 296(5568):695-8.
- [39] Jenkins DJ, Kendall CW, Augustin LS. et al. **“Glycemic index: overview of implication in health and disease”**. 2002. *Am J Clin Nutr*. 76:266S-273S.
- [40] Kumar D. **“From evidence-based medicine to genomic medicine”**. 2007. *Genomic Med*. 1(3-4):95-104.
- [41] Fenech M, El-Sohemy A, Cahill L. et al. **“Nutrigenetics and nutrigenomics: viewpoints on the current status and applications in nutrition research and practice”**. 2011. *J Nutrigenet Nutrigenomics*. 4(2):69-89.
- [42] Ryan-Harshman M, Vogel E, Jones-Taggart H. et al. **“Nutritional genomics and dietetic professional practice”**. 2008. *Can J Diet Pract Res*. 69(4):177-82.
- [43] DeBusk R. **“Diet-related disease, nutritional genomics, and food and nutrition professionals”**. 2009. *J Am Diet Assoc*. 109(3):410-3.
- [44] Rosati P. **“Istologia”**. 1981. *Edi Ermes*.
- [45] AAVV. **“Trattato di anatomia umana”**. 2006. *Edi Ermes*.
- [46] AAVV. **“Citologia e istologia funzionale”**. 2005. *Edi Ermes*.
- [47] Stromer MH, Goll DE, Young RB, Robson RM, Parrish FC Jr. **“Ultrastructural features of skeletal muscle differentiation and development”**. 1974. *J Anim Sci*. 38(5):1111-41.
- [48] Dreizen P. **“Structure and function of the myofibrillar contractile proteins”**. 1971. *Annu Rev Med*. 22:365-90.
- [49] D’Angelo E, Peres A. **“Fisiologia. Molecole, cellule e sistemi”**. 2006. *Edi Ermes*.
- [50] Alberts B. et al. **“Molecular biology of the cell”**. 2002. *Garland Science*.
- [51] Frank GB, Oz M. **“The functionale role of t-tubular calcium channels in skeletal muscle contractions”**. 1992. *Adv Exp Med Biol*. 311: 123-36.
- [52] Bianchi CP. **“Role or calcium channels of the sarcolemma and the sarcoplasmic reticulum in skeletal muscle functions”**. 1992. *Adv Exp Med Biol*. 311:237-44.

- [53] Maruyama K. **“Birth of the sliding filament concept in muscle contraction”**. 1995. *J Biochem.* 117(1):1-6.
- [54] Cooke R. **“The sliding filament model: 1972-2004”**. 2004. *J Gen Physiol.* 123(6):643-56.
- [55] Rosati P, Colombo R, Maraldi N. **“Istologia” 5° edizione**. 2006. *Edi Ermes*.
- [56] Schiaffino S, Reggiani C. **“Fiber types in mammalian skeletal muscle”**. 2011. *Physiol Rev.* 91(4): 1757-62.
- [57] Scott W, Stevens J, Binder-Macleod SA. **“Human skeletal muscle fiber type classifications”**. 2001. *Phys Ther.* 81(11): 1810-6.
- [58] Buchthal F, Schmalbruch H. **“Motor unit of mammalian muscle”**. 1980. *Physiol Rev.* 60(1):90-142.
- [59] English AW, Wolf SL. **“The motor unit. Anatomy and physiology”**. 1982. *Phys Ther.* 62(12):1763-72.
- [60] Murray BE, Froemming GR, Maguire PB, Ohlndieck K. **“Excitation-contraction-relaxation cycle: role of Ca²⁺-regulatory membrane proteins in normal, stimulated and pathological skeletal muscle (review)”**. 1998. *J Mol Med.* 1(4): 677-87.
- [61] Rosati P, Colombo R. **“Istologia”**. 1998. *Edi Ermes*.
- [62] Stockdale FE. **“Myogenic cell lineages”**. 1992. *Dev Biol.* 154(2): 284-98.
- [63] Spielholz NI. **“Skeletal muscle. A review of its development in vivo and in vitro”**. 1982. *Phys Ther.* 62(12):1757-62.
- [64] Relaix F, Zammit PS. **“Satellite cells are essential for skeletal muscle regeneration: the cell on the edge returns centre stage”**. 2012. *Development.* 139(16):2845-56.
- [65] James DR Knight, Rashmi Kothary. **“The myogenic kinome: protein kinases critical to mammalian skeletal myogenesis”**. 2011. *Skeletal Muscle.* 1:29.
- [66] Bentzinger CF, Wang YX, Rudnicki MA. **“Building muscle: molecular regulation of myogenesis”**. 2012. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 4(2).
- [67] Perry RL, Rudnick MA. **“Molecular mechanisms regulating myogenic determination and differentiation”**. 2000. *Front Biosci Sep.* 1; 5: D 750-67.
- [68] Kitzmann M, Fernandez A. **“Crosstalk between cell cycle regulators and the myogenic factor MyoD in skeletal myoblasts”**. 2001. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 58: 571-579.
- [69] Cossu G. et al. **“How is myogenesis initiated in the embryo?”**. 1996. *Trends Genet.* 12, 218-223.
- [70] Maione R, Armati P. **“Interdependence between muscle differentiation and cell-cycle control”**. 1997. *Biochim. Biophys. Acta* M19-M30.
- [71] Sabourin LA. **“The molecular regulation of myogenesis”**. 2000. *Clin Genet.* 57, 16-25.

- [72] Sartorelli V, Caretti G. **“Mechanisms underlying the transcriptional regulation of skeletal myogenesis”**. 2005. *Curr Opin Genet Dev.* 15(5) : 528-35.
- [73] Ferri P, Barbieri E, Burattini S, Guescini M. et al. **“Expression and subcellular localization of myogenic regulatory factors during the differentiation of skeletal muscle in C2C12 myoblasts”**. 2009. *Journal of Cellular Biochemistry.* 108: 1302-1317.
- [74] Buckingham M. et al. **“The formation of skeletal muscle: from somite to limb”**. 2003. *J. Anat.* 202, 59-68.
- [75] Yun K. **“Skeletal muscle determination and differentiation: story of a core regulatory network and its context”**. 1996. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8, 877-889.
- [76] Puri P.L, Sartorelli V. **“Regulation of muscle regulatory factors by DNA-binding, interacting proteins, and post-transcriptional modifications”**. 2000. *J. Cell Phys.* 185, 155-173.
- [77] Kablar B, Krastel K, Tajbakhsh S, Rudnicki MA. **“Myf5 and MyoD activation define independent myogenic compartments during embryonic development”**. 2003. *Dev Biol.* 258: 307-318.
- [78] Kaushal S. **“Activation of the myogenic lineage by MEF2A, a factor that induces and cooperates with MyoD”**. 1994. *Science.* 266, 1236-1240.
- [79] Walsh K, Perlman H. **“Cell cycle upon myogenic differentiation”**. 1997. *Current opinion in Genetics and Development.* 7, 597-602.
- [80] Berkes CA, Tapscott SJ. **“MyoD and the transcriptional control of myogenesis”**. 2005. *Semin Cell Dev Biol.* 16:585-595.
- [81] Dedieu S, Mazères G, Cottin P, Brustis JJ. **“Involvement of myogenic regulator factors during fusion in the cell line C2C12”**. 2002. *Int J Dev Biol.* 46: 235-241.
- [82] Bober E. et al. **“The muscle regulatory gene, Myf-6, has a biphasic pattern of expression during early mouse development”**. 1991. *J. Cell. Biol.* 113, 1255-1265.
- [83] Lagha M, Kormish JD, Rocancourt D, Manceau M. et al. **“Pax3 regulation of FGF signaling affects the progression of embryonic progenitor cells into the myogenic program”**. 2008. *Genes Dev.* 22(13):1828-37.
- [84] Olguin HC, Olwin BB. **“Pax-7 up-regulation inhibits myogenesis and cell cycle progression in satellite cells: a potential mechanism for self-renewal”**. 2004. *Dev Biol.* 275(2):375-88.
- [85] Rudnicki MA, Le Grand F, McKinnell I, Kuang S. **“The molecular regulation of muscle stem cell function”**. 2008. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 73:323-31.
- [86] Buckingham M. **“Skeletal muscle progenitor cells and the role of Pax genes”**. 2007. *C R Biol.* 330(6-7):530-3.

- [87] Buckingham M, Bajard L, Daubas P, Esner M, Lagha M. et al. **“Myogenic progenitor cells in the mouse embryo are marked by the expression of Pax3/7 genes that regulate their survival and myogenic potential”**. 2006. *Anat Embryol (Berl)*. 211 Suppl 1:51-6.
- [88] Zammit PS, Relaix F, Nagata Y, Ruiz AP, Collins CA. et al. **“Pax7 and myogenic progression in skeletal muscle satellite cells”**. 2006. *J Cell Sci*. 119(Pt 9):1824-32.
- [89] Zammit PS. **“All muscle satellite cells are equal, but are some more equal than others?”** 2008. *J Cell Sci*. 121(Pt 18):2975-82.
- [90] Oustanina S, Hause G, Braun T. **“Pax7 directs postnatal renewal and propagation of myogenic satellite cells but not their specification”**. 2004. *EMBO J*. 23(16):3430-9.
- [91] Benezra R. et al. **“The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins”**. 1990. *Cell*. 61, 49-59.
- [92] Norton JD, Deed RW, Craggs G, Sablitzky F. **“Id helix-loop-helix proteins in cell growth and differentiation”**. 1998. *Trends Cell Biol*. 8(2):58-65.
- [93] Zebedee Z, Hara E. **“Id proteins in cell cycle control and cellular senescence”**. 2001. *Oncogene*. 20(58):8317-25.
- [94] Rohwedel J, Horák V, Hebrok M, Füchtbauer EM, Wobus AM. **“M-twist expression inhibits mouse embryonic stem cell-derived myogenic differentiation in vitro”**. 1995. *Exp Cell Res*. 220(1):92-100.
- [95] Alway SE, Degens H, Lowe DA, Krishnamurthy G. **“Increased myogenic repressor Id mRNA and protein levels in hindlimb muscles of aged rats”**. 2002. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 282(2):R411-22.
- [96] Claycomb WC, Lanson NA Jr. **“Proto-oncogene expression in proliferating and differentiating cardiac and skeletal muscle”**. 1987. *Biochem J*. 247(3):701-6.
- [97] Li L, Chambard JC, Karin M, Olson EN. **“Fos and Jun repress transcriptional activation by myogenin and MyoD: the amino terminus of Jun can mediate repression”**. 1992. *Genes Dev*. 6(4):676-89.
- [98] Tapscott S.J. **“MyoD1: a nuclear phosphoprotein requiring a Myc homology region to convert fibroblasts to myoblasts”**. 1988. *Science*. 242, 405-411.
- [99] Templeton TJ, Hauschka SD. **“FGF-mediated aspects of skeletal muscle growth and differentiation are controlled by a high affinity receptor, FGFR1”**. 1992. *Dev Biol*. 154(1):169-81.
- [100] Sinha S, Hoofnagle MH, Kingston PA, McCanna ME, Owens GK. **“Transforming growth factor-beta1 signaling contributes to development of smooth muscle cells from embryonic stem cells”**. 2004. *Am J Physiol Cell Physiol*. 287(6):C1560-8.

- [101] Adi S, Bin-Abbas B, Wu NY, Rosenthal SM. **“Early stimulation and late inhibition of extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation by IGF-I: a potential mechanism mediating the switch in IGF-I action on skeletal muscle cell differentiation”**. 2000. *Endocrinology*. 143(2):511-6.
- [102] Olson E.N. **“MyoD family: a paradigm for development?”**. 1990. *Genes Dev*. 4, 1454-61.
- [103] Madaro L, Marrocco V, Fiore P, Aulino P, Smeriglio P, et al. **“PKC θ signaling is required for myoblast fusion by regulating the expression of caveolin-3 and β 1D integrin upstream focal adhesion kinase”**. 2011. *Mol Biol Cell*. 22(8):1409-19.
- [104] Hardy S, Kong Y, Konieczny SF. **“Fibroblast growth factor inhibits MRF4 activity independently of the phosphorylation status of a conserved threonine residue within the DNA-binding domain”**. 1993. *Mol Cell Biol*. 13(10):5943-56.
- [105] Backs J, Worst BC, Lehmann LH, Patrick DM, Jebessa Z. et al. **“Selective repression of MEF2 activity by PKA-dependent proteolysis of HDAC4”**. 2011. *J Cell Biol*. 195(3):403-15.
- [106] De Falco M., De Luca A. **“Involvement of cdks and cyclins in muscle differentiation”**. 2006. *Eur J Histochem*. 50: 19-23.
- [107] Ciavarra G, Ho AT, Cobrinik D, Zacksenhaus E. **“Critical role of the Rb family in myoblast survival and fusion”**. 2011. *PLoS One*. 6(3):e17682.
- [108] Sherr CJ, Roberts JM. **“CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression”**. 1999. *Genes Dev*. 13(12):1501-12.
- [109] Ostrovsky O, Bengal E. **“The mitogen-activated protein kinase cascade promotes myoblast cell survival by stabilizing the cyclin-dependent kinase inhibitor, p21WAF1 protein”**. 2003. *J Biol Chem*. 278(23):21221-31.
- [110] Halevy O, Novitch BG, Spicer DB, Skapek SX, Rhee J. et al. **“Correlation of terminal cell cycle arrest of skeletal muscle with induction of p21 by MyoD”**. 1995. *Science*. 267(5200):1018-21.
- [111] Chan HM, Shikama N, La Thangue NB. **“Control of gene expression and the cell cycle”**. 2001. *Essays Biochem*. 37:87-96.
- [112] Frolov MV, Dyson NJ. **“Molecular mechanisms of E2F-dependent activation and pRB-mediated repression”**. 2004. *J Cell Sci*. 117(Pt 11):2173-81.
- [113] Tedesco D, Caruso M, Fischer-Fantuzzi L, Vesco C. **“The inhibition of cultured myoblast differentiation by the simian virus 40 large T antigen occurs after myogenin expression and Rb up-regulation and is not exerted by transformation-competent cytoplasmic mutants”**. 1995. *J Virol*. 69(11):6947-57.

- [114] De Falco G, Comes F, Simone C. **"pRb: master of differentiation. Coupling irreversible cell cycle withdrawal with induction of muscle-specific transcription"**. 2006. *Oncogene*. 25(38):5244-9.
- [115] Schneider JW, Gu W, Zhu L, Mahdavi V, Nadal-Ginard B. **"Reversal of terminal differentiation mediated by p107 in Rb-/- muscle cells"**. 1994. *Science*. 264(5164):1467-71.
- [116] Cribb PJ, Hayes A. **"Effects of supplement timing and resistance exercise on skeletal muscle hypertrophy"**. 2006. *Med Sci Sports Exerc*. 38(11):1918-25.
- [117] Bogdanis GC. **"Effects of physical activity and inactivity on muscle fatigue"**. 2012. *Front Physiol*. 3:142.
- [118] van Wessel T, de Haan A, van der Laarse WJ, Jaspers RT. **"The muscle fiber type-fiber size paradox: hypertrophy or oxidative metabolism?"** 2010. *Eur J Appl Physiol*. 110(4):665-94.
- [119] Song YH, Li Y, Du J, Mitch WE, Rosenthal N, Delafontaine P. **"Muscle-specific expression of IGF-1 blocks angiotensin II-induced skeletal muscle wasting"**. 2005. *Clin Invest*. 115(2):451-8.
- [120] Rommel C, Bodine SC, Clarke BA, Rossman R, Nunez L, et al. **"Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways"**. 2001. *Nat Cell Biol*. 3(11):1009-13.
- [121] Cornu M, Albert V, Hall MN. **"mTOR in aging, metabolism, and cancer"**. 2013. *Curr Opin Genet Dev*. pii: S0959-437X(12)00149-9.
- [122] Bjornsti MA, Houghton PJ. **"The TOR pathway: a target for cancer therapy"**. 2004. *Nat Rev Cancer*. 4(5):335-48.
- [123] Wullschlegel S, Loewith R, Oppliger W, Hall MN. **"Molecular organization of target of rapamycin complex 2"**. 2005. *J Biol Chem*. 280(35):30697-704.
- [124] Jacinto E, Loewith R, Schmidt A, Lin S, Ruegg MA, et al. **"Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin in sensitive"**. 2004. *Nat Cell Biol*. 6(11):1122-8.
- [125] Tang SJ, Reis G, Kang H, Gingras AC, Sonenberg N, Schuman EM. **"A rapamycin-sensitive signaling pathway contributes to long-term synaptic plasticity in the hippocampus"**. 2002. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99(1):467-72.
- [126] Bracho-Valdés I, Moreno-Alvarez P, Valencia-Martínez I, Robles-Molina E, Chávez-Vargas L, Vázquez-Prado J. **"mTORC1- and mTORC2-interacting proteins keep their multifunctional partners focused"**. 2011. *IUBMB Life*. 63(10):896-914.
- [127] Thomas G. **"The S6 kinase signaling pathway in the control of development and growth"**. 2002. *Biol Res*. 35(2):305-13.

- [128] Inoki K, Ouyang H, Li Y, Guan KL. **“Signaling by target of rapamycin proteins in cell growth control”**. 2005. *Microbiol Mol Biol Rev.* 69(1):79-100.
- [129] Kenessey A, Ojamaa K. **“Thyroid hormone stimulates protein synthesis in the cardiomyocyte by activating the Akt-mTOR and p70S6K pathways”**. 2006. *J Biol Chem.* 281(30):20666-72.
- [130] Conus NM, Hemmings BA, Pearson RB. **“Differential regulation by calcium reveals distinct signaling requirements for the activation of Akt and p70S6k”**. 1998. *J Biol Chem.* 273(8):4776-82.
- [131] Goldspink G. **“Impairment of IGF-I gene splicing and MGF expression associated with muscle wasting”**. 2005. *Int J Biochem Cell Biol.* 37(10):2012-22.
- [132] Pelosi L, Giacinti C, Nardis C, Borsellino G, Rizzuto E, Nicoletti C. **“Local expression of IGF-1 accelerates muscle regeneration by rapidly modulating inflammatory cytokines and chemokines”**. 2007. *FASEB J.* 21(7):1393-402.
- [133] Goldspink G. **“Mechanical signals, IGF-I gene splicing, and muscle adaptation”**. 2005. *Physiology (Bethesda).* 20:232-8.
- [134] Musarò A, Giacinti C, Borsellino G, Dobrowolny G, Pelosi L. et al. **“Stem cell-mediated muscle regeneration is enhanced by local isoform of insulin-like growth factor 1”**. 2004. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(5):1206-10.
- [135] Owino V, Yang SY, Goldspink G. **“Age-related loss of skeletal muscle function and the inability to express the autocrine form of insulin-like growth factor-1 (MGF) in response to mechanical overload”**. 2001. *FEBS Lett.* 505(2):259-63.
- [136] Musarò A, McCullagh KJ, Naya FJ, Olson EN, Rosenthal N. **“IGF-1 induces skeletal myocyte hypertrophy through calcineurin in association with GATA-2 and NF-ATc1”**. 1999. *Nature.* 400(6744):581-5.
- [137] Rommel C, Clarke BA, Zimmermann S, Nuñez L, Rossman R. et al. **“Differentiation stage-specific inhibition of the Raf-MEK-ERK pathway by Akt”**. 1999. *Science.* 286(5445):1738-41.
- [138] Semsarian C, Sutrove P, Richmond DR, Graham RM. **“Insulin-like growth factor (IGF-I) induces myotube hypertrophy associated with an increase in anaerobic glycolysis in a clonal skeletal-muscle cell model”**. 1999. *Biochem J.* 339 (Pt 2):443-51.
- [139] Tee AR, Fingar DC, Manning BD, Kwiatkowski DJ, Cantley LC, Blenis J. **“Tuberous sclerosis complex-1 and -2 gene products function together to inhibit mammalian target of rapamycin (mTOR)-mediated downstream signaling”**. 2002. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(21):13571-6.

- [140] Goncharova EA, Goncharov DA, Eszterhas A, Hunter DS, Glassberg MK. **“Tuberin regulates p70 S6 kinase activation and ribosomal protein S6 phosphorylation. A role for the TSC2 tumor suppressor gene in pulmonary lymphangioleiomyomatosis (LAM)”**. 2002. *J Biol Chem.* 277(34):30958-67.
- [141] Kahn BB, Alquier T, Carling D, Hardie DG **“AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism”**. 2005. *Cell Metab.* 1(1):15-25.
- [142] Hardie DG, Ross FA, Hawley SA **“AMP-activated protein kinase: a target for drugs both ancient and modern”**. 2012. *Chem Biol.* 19(10):1222-36.
- [143] Chen Z, Heierhorst J, Mann RJ, Mitchelhill KI, Michell BJ. et al. **“Expression of the AMP-activated protein kinase beta1 and beta2 subunits in skeletal muscle”**. 1999. *FEBS Lett.* 460(2):343-8.
- [144] Sanz P. **“AMP-activated protein kinase: structure and regulation”**. 2008. *Curr Protein Pept Sci.* 9(5):478-92.
- [145] Hawley SA, Boudeau J, Reid JL, Mustard KJ, Udd L. et al. **“Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade”**. 2003. *J Biol.* 2(4):28.
- [146] Oakhill JS, Scott JW, Kemp BE. **“AMPK functions as an adenylate charge-regulated protein kinase”**. 2012. *Trends Endocrinol Metab.* 23(3):125-32.
- [147] Carling D, Mayer FV, Sanders MJ, Gamblin SJ. **“AMP-activated protein kinase: nature's energy sensor”**. 2011. *Nat Chem Biol.* 7(8):512-8.
- [148] Hardie DG. **“Sensing of energy and nutrients by AMP-activated protein kinase”**. 2011. *Am J Clin Nutr.* 93(4):891S-6.
- [149] O'Neill HM, Holloway GP, Steinberg GR. **“AMPK regulation of fatty acid metabolism and mitochondrial biogenesis: Implications for obesity”**. 2012. *Mol Cell Endocrinol.* [Epub ahead of print].
- [150] Sanchez AM, Candau RB, Csibi A, Raibon A. et al. **“The role of AMP-activated protein kinase in the coordination of skeletal muscle turnover and energy homeostasis”**. 2012. *Am J Physiol Cell Physiol.* 303(5):C475-85.
- [151] Long YC., Cheng Z., Copps KD., White MF. **“Insulin receptor substrates Irs1 and Irs2 coordinate skeletal muscle growth and metabolism via the Akt and AMPK pathways”**. 2011. *Mol Cell Biol.* 31(3):430-41.

- [152] Hutber CA, Hardie DG, Winder WW. **“Electrical stimulation inactivates muscle acetyl-CoA carboxylase and increases AMP-activated protein kinase”**. 1997. *Am J Physiol*. 272(2 Pt 1):E262-6.
- [153] Aschenbach WG, Sakamoto K, Goodyear LJ. **“5' adenosine monophosphate-activated protein kinase, metabolism and exercise”**. 2004. *Sports Med*. 34(2):91-103.
- [154] Musi N, Yu H, Goodyear LJ. **“AMP-activated protein kinase regulation and action in skeletal muscle during exercise”**. 2003. *Biochem Soc Trans*. 31(Pt 1):191-5.
- [155] Musi N, Goodyear LJ. **“AMP-activated protein kinase and muscle glucose uptake”**. 2003. *Acta Physiol Scand*. 178(4):337-45.
- [156] Renaud S, de Lorgeril M. **“Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease”**. 1992. *Lancet*. 339(8808):1523-6.
- [157] Giugliano D, Esposito K. **“Mediterranean diet and metabolic diseases”**. 2008. *Curr Opin Lipidol*. 19(1):63-8.
- [158] Urquiaga I, Echeverría G, Polic G, Castillo O, Liberona Y. et al. **“Mediterranean food and diets, global resource for the control of metabolic syndrome and chronic diseases”**. 2008. *World Rev Nutr Diet*. 98:150-73.
- [159] Mann V, Huber C, Kogianni G, Collins F, Noble B. **“The antioxidant effect of estrogen and Selective Estrogen Receptor Modulators in the inhibition of osteocyte apoptosis in vitro”**. 2007. *Bone*. 40(3):674-84.
- [160] López-Alarcón C, Denicola A. **“Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays”**. 2013. *Anal Chim Acta*. 763:1-10.
- [161] Seeram NP, Aviram M, Zhang Y, Henning SM, Feng L, Dreher M, Heber D. **“Comparison of antioxidant potency of commonly consumed polyphenol-rich beverages in the United States”**. 2008. *J Agric Food Chem*. 56(4):1415-22.
- [162] Prior RL, Cao G. **“Antioxidant capacity and polyphenolic components of teas: implications for altering in vivo antioxidant status”**. 1999. *Proc Soc Exp Biol Med*. 220(4):255-61.
- [163] Shazib Pervaiz, Andrea Lisa Holme. **“Resveratrol: its biologic targets and functional activity”**. 2009. *Comprehensive Invited Review ANTIOXIDANT & REDOX SIGNALING. Volume 11, Number 11*.
- [164] Francine Z, Marques M, M. Andrea Markus, Brian J. Morris. **“Resveratrol: Cellular actions of a potent natural chemical that confers a diversity of health benefits”**. 2009. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 41(11):2125-8.

- [165] Shakibaei M, Harikumar KB, Aggarwal BB. **“Resveratrol addiction: to die or not to die”**. 2009. *Mol Nutr Food Res*. 53(1):115-28.
- [166] Baur JA, Sinclair DA. **“Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence”**. 2006. *Nat Rev Drug Discov*. 5(6):493-506.
- [167] Nakata R, Takahashi S, Inoue H. **“Recent advances in the study on resveratrol”**. 2012. *Biol Pharm Bull*. 35(3):273-9.
- [168] Zhou SF, Xue CC, Yu XQ, Wang G. **“Metabolic activation of herbal and dietary constituents and its clinical and toxicological implications: an update”**. 2007. *Curr Drug Metab*. 8(6):526-53.
- [169] Marier JF, Vachon P, Gritsas A, Zhang J, Moreau JP, Ducharme MP. **“Metabolism and disposition of resveratrol in rats: extent of absorption, glucuronidation, and enterohepatic recirculation evidenced by a linked-rat model”**. 2002. *J Pharmacol Exp Ther*. 302(1):369-73.
- [170] Vitrac X, Desmoulière A, Brouillaud B, Krisa S, Deffieux G., et al. **“Distribution of [14C]-trans-resveratrol, a cancer chemopreventive polyphenol, in mouse tissues after oral administration”**. 2003. *Life Sci*. 72(20):2219-33.
- [171] Kaldas MI, Walle UK, Walle T. **“Resveratrol transport and metabolism by human intestinal Caco-2 cells”**. 2003. *J Pharm Pharmacol*. 55(3):307-12.
- [172] Lançon A, Delmas D, Osman H, Thénot JP, Jannin B, Latruffe N. **“Human hepatic cell uptake of resveratrol: involvement of both passive diffusion and carrier-mediated process”**. 2004. *Biochem Biophys Res Commun*. 316(4):1132-7.
- [173] Gehm BD, McAndrews JM, Chien PY, Jameson JL. **“Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor”**. 1997. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94(25):14138-43.
- [174] Vetterli L, Maechler P. **“Resveratrol-activated SIRT1 in liver and pancreatic β -cells: a Janus head looking to the same direction of metabolic homeostasis”**. 2011. *Aging (Albany NY)*. 3(4):444-9.
- [175] Alcaín FJ, Villalba JM. **“Sirtuin activators”**. 2009. *Expert Opin Ther Pat*. 19(4):403-14.
- [176] Knutson MD, Leeuwenburgh C. **“Resveratrol and novel potent activators of SIRT1: effects on aging and age-related diseases”**. 2008. *Nutr Rev*. 66(10):591-6.
- [177] Bradamante S, Barengi L, Villa A. **“Cardiovascular protective effects of resveratrol”**. 2004. *Cardiovasc. Drug Rev*. 22, 169—188.
- [178] El-Mowafy AM, Alkhalaf M, Nassar NN. **“Resveratrol reverses ET-1-evoked mitogenic effects in human coronary arterial cells by activating the kinase-G to inhibit ERK-enzymes”**. 2009. *Int J Cardiol*. 136(3):263-9.

- [179] Takahashi S, Nakashima Y. **“Repeated and long-term treatment with physiological concentrations of resveratrol promotes NO production in vascular endothelial cells”**. 2011. *Br. J. Nutr.* 104, 1—7.
- [180] Klinge CM, Blankenship KA, Risinger KE, Bhatnagar S, Noisin EL. **“Resveratrol and estradiol rapidly activate MAPK signaling through estrogen receptors α and β in endothelial cells”**. 2005. *J. Biol. Chem.* 280, 7460—7468.
- [181] Sulaiman M, Matta MJ, Sunderesan NR, Gupta MP, Periasamy M, Gupta M. **“Resveratrol, an activator of SIRT1, upregulates sarcoplasmic calcium ATPase and improves cardiac function in diabetic cardiomyopathy”**. 2010. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 298(3):H833-43.
- [182] Sheu SJ, Bee YS, Chen CH. **“Resveratrol and large-conductance calcium-activated potassium channels in the protection of human retinal pigment epithelial cells”**. 2008. *J Ocul Pharmacol Ther.* 24(6):551-5.
- [183] Aggarwal BB, Bhardwaj A, Aggarwal RS, Seeram NP, Shishodia S, Takada Y. **“Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies”**. 2004. *Anticancer Res.* 24(5A):2783-840.
- [184] Wang S, Wang X, Yan J, Xie X, Fan F. et al. **“Resveratrol inhibits proliferation of cultured rat cardiac fibroblasts: correlated with NO-cGMP signaling pathway”**. 2007. *Eur J Pharmacol.* 567(1-2):26-35.
- [185] Shen M, Wu RX, Zhao L, Li J, Guo HT, Fan R. et al. **“Resveratrol attenuates ischemia/reperfusion injury in neonatal cardiomyocytes and its underlying mechanism”**. 2012. *PLoS One.* 7(12):e51223.
- [186] Mietus-Snyder M, Gowri MS, Pitas RE. **“Class A scavenger receptor up-regulation in smooth muscle cells by oxidized low density lipoprotein. Enhancement by calcium flux and concurrent cyclooxygenase-2 up-regulation”**. 2000. *J Biol Chem.* 275(23):17661-70.
- [187] Jang JH, Surh YJ. **“Protective effects of resveratrol on hydrogen peroxide-induced apoptosis in rat pheochromocytoma (PC12) cells”**. 2001. *Mutat Res.* 496(1-2):181-90.
- [188] Juhasz B, Varga B, Gesztelyi R, Kemeny-Beke A, Zsuga J, Tosaki A. **“Resveratrol: a multifunctional cytoprotective molecule”**. 2010. *Curr Pharm Biotechnol.* 11(8):810-8.
- [189] Zou J, Huang Y, Chen Q, Wei E, Cao K, Wu JM. **“Effects of resveratrol on oxidative modification of human low density lipoprotein”**. 2000. *Chin Med J (Engl).* 113(2):99-102.
- [190] Bhavnani BR, Cecutti A, Gerulath A, Woolever AC, Berco M. **“Comparison of the antioxidant effects of equine estrogens, red wine components, vitamin E, and probucol on low-density lipoprotein oxidation in postmenopausal women”**. 2001. *Menopause.* 8(6):408-19.

- [191] Frémont L, Gozzelino MT, Linard A. **“Response of plasma lipids to dietary cholesterol and wine polyphenols in rats fed polyunsaturated fat diets”**. 2000. *Lipids*. 35(9):991-9.
- [192] Murase T, Haramizu S, Ota N, Hase T. **“Suppression of the aging-associated decline in physical performance by a combination of resveratrol intake and habitual exercise in senescence-accelerated mice”**. 2009. *Biogerontology*. 10(4):423-34.
- [193] Brooks CL, Gu W. **“How does SIRT1 affect metabolism, senescence and cancer?”** 2009. *Nat Rev Cancer*. 9(2):123-8.
- [194] Arend WP, Dayer JM. **“Inhibition of the production and effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in rheumatoid arthritis”**. 1995. *Arthritis Rheum*. 38(2):151-60.
- [195] Zhu X, Liu Q, Wang M, Liang M, Yang X, Xu X, Zou H, Qiu J. **“Activation of Sirt1 by resveratrol inhibits TNF- α induced inflammation in fibroblasts”**. 2011. *PLoS One*. 6(11):e27081.
- [196] Szkudelska K, Szkudelski T. **“Resveratrol, obesity and diabetes”**. 2010. *Eur J Pharmacol*. 635(1-3):1-8.
- [197] Szkudelski T, Szkudelska K. **“Anti-diabetic effects of resveratrol”**. 2011. *Ann N Y Acad Sci*. 1215:34-9.
- [198] Liu ZP, Li WX, Yu B, Huang J, Sun J, Huo JS, Liu CX. **“Effects of trans-resveratrol from *Polygonum cuspidatum* on bone loss using the ovariectomized rat model”**. 2005. *J Med Food*. 8(1):14-9.
- [199] Shakibaei M, Shayan P, Busch F, Aldinger C, Buhrmann C, Lueders C, Mobasheri A. **“Resveratrol mediated modulation of Sirt-1/Runx2 promotes osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells: potential role of Runx2 deacetylation”**. 2012. *PLoS One*. 7(4):e35712.
- [200] Do GM, Jung UJ, Park HJ, Kwon EY, Jeon SM, McGregor RA, Choi MS. **“Resveratrol ameliorates diabetes-related metabolic changes via activation of AMP-activated protein kinase and its downstream targets in db/db mice”**. 2012. *Mol Nutr Food Res*. 56(8):1282-91.
- [201] Brasnyó P, Molnár GA, Mohás M, Markó L, Laczy B. et al. **“Resveratrol improves insulin sensitivity, reduces oxidative stress and activates the Akt pathway in type 2 diabetic patients”**. 2011. *Br J Nutr*. 106(3):383-9.
- [202] Chang Eun Park, Min-Jung Kim, Jong Hwa Lee, Byung-II Min et al. **“Resveratrol stimulates glucose transport in C2C12 myotubes by activating AMP-activated protein kinase”**. 2007. *EXPERIMENTAL and MOLECULAR MEDICINE*, Vol.39 No 2, 222-229.
- [203] Amie J. Dirks Naylor. **“Cellular effects of resveratrol in skeletal muscle”**. 2009. *Minireview Life Science*. 84 637-640.

- [204] Jiang H, Shang X, Wu H, Gautam SC, Al-Holou S, Li C, Kuo J, Zhang L, Chopp M. **“Resveratrol downregulates PI3K/Akt/mTOR signaling pathways in human U251 glioma cells”**. 2009. *J Exp Ther Oncol*. 8(1):25-33.
- [205] Burgess TA, Robich MP, Chu LM, Bianchi C, Sellke FW. **“Improving glucose metabolism with resveratrol in a swine model of metabolic syndrome through alteration of signaling pathways in the liver and skeletal muscle”**. 2011. *Arch Surg*. 146(5):556-64.
- [206] Hwang JT, Kwon DY, Park OJ, Kim MS. **“Resveratrol protects ROS-induced cell death by activating AMPK in H9c2 cardiac muscle cells”**. 2008. *Genes Nutr*. 2(4):323-6.
- [207] Dolinsky VW, Jones KE, Sidhu RS, Haykowsky M, Czubryt MP, Gordon T, Dyck JR. **“Improvements in skeletal muscle strength and cardiac function induced by resveratrol during exercise training contribute to enhanced exercise performance in rats”**. 2012. *J Physiol*. 590(Pt 11):2783-99.
- [208] Sharples AP, Stewart CE. **“Myoblast models of skeletal muscle hypertrophy and atrophy”**. 2011. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 14(3):230-6.
- [209] Burattini S., Ferri P., Battistelli M., Curci R., Luchetti F., Falcieri E. **“C2C12 murine myoblasts as a model of skeletal muscle development: morpho-functional characterization”**. 2004. *Eur J Histochem*. 48(3):223-33.
- [210] Kapetanovic IM, Muzzio M, Huang Z, Thompson TN, McCormick DL. **“Pharmacokinetics, oral bioavailability, and metabolic profile of resveratrol and its dimethylether analog, pterostilbene, in rats”**. 2011. *Cancer Chemother Pharmacol*. 68(3):593-601.
- [211] J. King, UK Laemmly. **“Polypeptides of the tail fibres of bacteriophage T4”**. 1971. *J. Mol. Biol*. 62,465-477.
- [212] Kruger NJ. **“The Bradford method for protein quantitation”**. 1994. *Methods Mol Biol*. 32:9-15.
- [213] Terruzzi I, Senesi P, Magni C, Montesano A, Scarafoni A, Luzi L, Duranti M. **“Insulin-mimetic action of conglutin- γ , a lupin seed protein, in mouse myoblasts”**. 2011. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 21(3):197-205.
- [214] Sjöblom B., Salmazo A., Djinić-Carugo K. **“Alpha-actinin structure and regulation”**. 2008. *Cell Mol Life Sci*. 65(17):2688-701.
- [215] Buckingham M. **“How the community effect orchestrates muscle differentiation”**. 2002. *BioEssays*. 25, 13-16.
- [216] Kanaco Tanaka et al. **“Evidence for cell density affecting C2C12 myogenesis: possible regulation of myogenesis by cell-cell communication”**. 2011. *Muscle Nerve*. 44: 968–977.

- [217] Cossu G. et al. **“Myoblast differentiation during mammalian somitogenesis is dependent upon a community effect”**. 1995. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92(6):2254-8.
- [218] Sung-Ho Kook, Ki-Choon Choi, Young-Ok Son, Kyung-Yeol Lee et al. **“Involvement of p38 MAPK-mediated signaling in the calpeptin-mediated suppression of myogenic differentiation and fusion in C2C12 cells”**. 2008. *Mol Cell Biochem*. 310: 85-92.
- [219] Taulet N., Comunale F., Favard C., Charrasse S. et al. **“N-cadherin/p120 catenin association at cell-cell contacts occurs in cholesterol-rich membrane domains and is required for RhoA activation and myogenesis”**. 2009. *J Biol Chem*. 284(34):23137-45.
- [220] Goichberg P, Geiger B. **“Direct involvement of N-cadherin-mediated signaling in muscle differentiation”**. 1998. *Mol Biol Cell*. 9(11):3119-31.
- [221] Glass DJ. **“Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways”**. 2005. *Int J Biochem Cell Biol*. 37(10):1974-84.
- [222] Otto A., Patel K. **“Signalling and the control of skeletal muscle size”**. 2010. *Exp Cell Res*. 316(18):3059-66.
- [223] Coolican SA. et al. **“The mitogenic and myogenic actions of insulin-like growth factors utilize distinct signaling pathways”**. 1997. *J. Biol. Chem*. 272, 6653-6662.
- [224] Li J, Johnson SE. **“ERK2 is required for efficient terminal differentiation of skeletal myoblasts”**. 2006. *Biochem Biophys Res Commun*. 345(4):1425-33.
- [225] Faust D. et al. **“p38 α MAPK is required for contact inhibition”**. 2005. *Oncogene* 24, 7941-7945.
- [226] Kang DC, Motwani M, Fisher PB. **“Role of the transcription factor AP-1 in melanoma differentiation (review)”**. 1998. *Int J Oncol*. 13(6):1117-26.
- [227] Ramachandran A, Gangopadhyay SS, Krishnan R, Ranpura SA, Rajendran K. et al. **“JunB Mediates Basal- and TGF β 1-Induced Smooth Muscle Cell Contractility”**. 2013. *PLoS One*. 8(1):e53430.
- [228] McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ. **“Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member”**. 1997. *Nature*. 387(6628):83-90.
- [229] Sartorelli V, Fulco M. **“Molecular and cellular determinants of skeletal muscle atrophy and hypertrophy”**. 2004. *Sci STKE*. (244):re11.
- [230] Nader GA. **“Molecular determinants of skeletal muscle mass: getting the "AKT" together.”** 2005. *Int J Biochem Cell Biol*. 37(10):1985-96.
- [231] Sandri M. **“Signaling in muscle atrophy and hypertrophy”**. 2008. *Physiology (Bethesda)*. 23:160-70.

- [232] Chargè S, Rudnicki M. **“Cellular and molecular regulation of muscle regeneration”**. 2004. *Physiol. Rev.* 84(1): 209-238.
- [233] Folker ES, Schulman VK, Baylies MK. **“Muscle length and myonuclear position are independently regulated by distinct Dynein pathways”**. 2012. *Development*. 139(20):3827-37.
- [234] Lai KM. et al. **“Conditional activation of akt in adult skeletal muscle induces rapid hypertrophy”**. 2004. *Mol. Cell Biol.* 24, 9295-9304.
- [235] I-Chien Liao, Jason B. Liu, Nenad Bursac, Kam W. Leong. **“Effect of Electromechanical Stimulation on the Maturation of Myotubes on Aligned Electrospun Fibers”**. 2009. *Cell Mol Bioeng.* 1(2-3): 133–145.
- [236] Taiyi Kuo, Michelle J. Lew, Oleg Mayba, Charles A. Harris, Terence P. Speed, and Jen-Chywan Wang. **“Genome-wide analysis of glucocorticoid receptor-binding sites in myotubes identifies gene networks modulating insulin signaling”**. 2012. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109(28): 11160–11165.
- [237] Kaminski J, Lançon A, Aires V, Limagne E. et al. **“Resveratrol initiates differentiation of mouse skeletal muscle-derived C2C12 myoblasts”**. 2012. *Biochem Pharmacol.* 84(10):1251-9.
- [238] Frederic Lluís, Eusebio Perdigüero, Angel R. Nebreda and Pura Muñoz-Canoves. **“Regulation of skeletal muscle gene expression by p38 MAP kinases”**. 2006. *TRENDS in Cell Biology.* Vol.16 No.1.
- [239] Rochlin K, Yu S, Roy S, Baylies MK. **“Myoblast fusion: when it takes more to make one”**. 2010. *Dev Biol.* 341(1):66-83.
- [240] Shadfar S, Couch ME, McKinney KA, Weinstein LJ, Yin X, Rodríguez JE, Guttridge DC, Willis M. **“Oral resveratrol therapy inhibits cancer-induced skeletal muscle and cardiac atrophy in vivo”**. 2011. *Nutr Cancer.* 63(5):749-62.
- [241] Mastroiannopoulos NP, Nicolaou P, Anayasa M, Uney JB, Phylactou LA. **“Down-regulation of myogenin can reverse terminal muscle cell differentiation”**. 2012. *PLoS One.* 7(1):e29896.
- [242] Parker MH, von Maltzahn J, Bakkar N, Al-Joubori B, Ishibashi J, Guttridge D, Rudnicki MA. **“MyoD-dependent regulation of NF-κB activity couples cell-cycle withdrawal to myogenic differentiation”**. 2012. *Skelet Muscle.* 2(1):6.
- [243] Mokalled MH, Johnson AN, Creemers EE, Olson EN. **“MASTR directs MyoD-dependent satellite cell differentiation during skeletal muscle regeneration”**. 2012. *Genes Dev.* 26(2):190-202.
- [244] Gavard J. et al. **“N-cadherin activation substitutes for the cell contact control in cell cycle arrest and myogenic differentiation”**. 2004. *J. Biol. Chem.* 279, 36795-36802.

- [245] Nelson J. et al. **“Convergence of Wnt, β -Catenin, and Cadherin pathways”**. 2004. *Science* 303, 1483-1487.
- [246] Sabatelli P, Pellegrini C, Faldini C, Merlini L. **“Cytoskeletal and extracellular matrix alterations in limb girdle muscular dystrophy 2I muscle fibers”**. 2012. *Neurol India*. 60(5):510-1.
- [247] Philippou A, Maridaki M, Halapas A, Koutsilieris M. **“The role of the insulin-like growth factor-I (IGF-I) in skeletal muscle physiology”**. 2007. *In Vivo*. 21:45–54.
- [248] Ye F, Mathur S, Liu M, Borst SE, Walter GA, Sweeney HL, Vandenborne K. **“Overexpression of IGF-1 attenuates skeletal muscle damage and accelerates muscle regeneration and functional recovery after disuse”**. 2013. *Exp Physiol*. [Epub ahead of print].
- [249] Gumucio JP, Mendias CL. **“Atrogin-1, MuRF-1, and sarcopenia”**. 2013. *Endocrine*. 43(1):12-21.
- [250] Yoshida T, Semprun-Prieto L, Sukhanov S, Delafontaine P. **“IGF-1 prevents ANG II-induced skeletal muscle atrophy via Akt- and Foxo-dependent inhibition of the ubiquitin ligase atrogin-1 expression”**. 2010. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 298(5):H1565-70.
- [251] Sakuma K, Yamaguchi A. **“Sarcopenia and cachexia: the adaptations of negative regulators of skeletal muscle mass”**. 2012. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 3(2):77-94.
- [252] Alamdari N, Aversa Z, Castellero E, Gurav A, Petkova V, Tizio S, Hasselgren PO. **“Resveratrol prevents dexamethasone-induced expression of the muscle atrophy-related ubiquitin ligases atrogin-1 and MuRF1 in cultured myotubes through a SIRT1-dependent mechanism”**. 2012. *Biochem Biophys Res Commun*. 417(1):528-33.
- [253] Breen DM, Sanli T, Giacca A, Tsiani E. **“Stimulation of muscle cell glucose uptake by resveratrol through sirtuins and AMPK”**. 2008. *Biochem Biophys Res Commun*. 374:117–122.
- [254] Zang M, Xu S, Maitland-Toolan KA et al. **“Polyphenols stimulate AMP-activated protein kinase, lower lipids, and inhibit accelerated atherosclerosis in diabetic LDL receptor-deficient mice”**. 2006. *Diabetes*. 55:2180–2191.
- [255] Lee YE, Kim JW, Lee EM, Ahn YB, Song KH, Yoon KH, Kim HW, Park CW, Li G, Liu Z, Ko SH. **“Chronic resveratrol treatment protects pancreatic islets against oxidative stress in db/db mice”**. 2012. *PLoS One*. 7(11):e50412.
- [256] Kang NE, Ha AW, Kim JY, Kim WK. **“Resveratrol inhibits the protein expression of transcription factors related adipocyte differentiation and the activity of matrix metalloproteinase in mouse fibroblast 3T3-L1 preadipocytes”**. 2012. *Nutr Res Pract*. 6(6):499-504.

- [257] Marzetti E, Calvani R, Bernabei R, Leeuwenburgh C. **“Apoptosis in skeletal myocytes: a potential target for interventions against sarcopenia and physical frailty - a mini-review”**. 2012. *Gerontology*. 58(2):99-106.
- [258] M. Lagouge C, Argmann Z, Gerhart-Hines et al. **“Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 α ”**. 2006. *Cell*. Vol. 127, no. 6, pp. 1109–1122.
- [259] J. L. Barger, T. Kayo, J. M. Vann et al. **“A low dose of dietary resveratrol partially mimics caloric restriction and retards aging parameters in mice”**. 2008. *PLoS ONE*. Vol. 3, no. 6, p. e2264.
- [260] Powers SK, Talbert EE, Adihetty PJ. **“Reactive oxygen and nitrogen species as intracellular signals in skeletal muscle”**. 2011. *J Physiol*. 589(Pt 9):2129-38.
- [261] Kim HJ, Kim IK, Song W, Lee J, Park S. **“The synergic effect of regular exercise and resveratrol on kainate-induced oxidative stress and seizure activity in mice”**. 2013. *Neurochem Res*. 38(1):117-22.
- [262] Menzies KJ, Singh K, Saleem A, Hood DA. **“Sirtuin 1-mediated effects of exercise and resveratrol on mitochondrial biogenesis”**. 2013. *J Biol Chem*. [Epub ahead of print].
- [263] Tomasello B, Grasso S, Malfa G, Stella S, Favetta M, Renis M. **“Double-face activity of resveratrol in voluntary runners: assessment of DNA damage by comet assay”**. 2012. *J Med Food*. 15(5):441-7.
- [264] Amri A, Chaumeil JC, Sfar S, Charrueau C. **“Administration of resveratrol: What formulation solutions to bioavailability limitations?”**. 2012. *J Control Release*. 158(2):182-93.
- [265] Ole Vang, Nihal Ahmad, Clifton A. Baile, Joseph A. Baur, Karen Brown et al. **“What Is New for an Old Molecule? Systematic Review and Recommendations on the Use of Resveratrol”**. 2011. *PLoS One*. 6(6): e19881.
- [266] Patel KR, Scott E, Brown VA, Gescher AJ, Steward WP, Brown K. **“Clinical trials of resveratrol”**. 2011. *Ann N Y Acad Sci*. 1215:161-9.
- [267] He S, Yan X. **“From Resveratrol to Its Derivatives: New Sources of Natural Antioxidant”**. 2012. *Curr Med Chem*. [Epub ahead of print].
- [268] Giovinazzo G, Ingrosso I, Paradiso A, De Gara L, Santino A. **“Resveratrol biosynthesis: plant metabolic engineering for nutritional improvement of food”**. 2012. *Plant Foods Hum Nutr*. 67(3):191-9.
- [269] Pezzuto JM. **“The phenomenon of resveratrol: redefining the virtues of promiscuity”**. 2011. *Ann N Y Acad Sci*. 1215:123-30.

Ringraziamenti

Si corre veloci verso la meta...e, una volta raggiunta, ci si volta indietro...per ricordare e ringraziare le persone con cui è stato condiviso il cammino...

*Vorrei ringraziare il **Prof. Livio Luzi**, mio tutor e coordinatore del corso di Dottorato in Scienze dello Sport, per la sua disponibilità e l'attenzione con cui mi ha seguita nel corso di questi anni di lavoro nel suo gruppo di ricerca.*

*Ringrazio la **Dott.ssa Ileana Terruzzi**, per avermi accolto nel gruppo di ricerca subito dopo la mia laurea magistrale. Grazie per avermi guidata in questi anni di lavoro e per i preziosi consigli forniti nella stesura della tesi.*

*Vorrei ringraziare in modo super speciale la **Dott.ssa Pamela Senesi**, collega di lavoro e di mille avventure in questi anni. In laboratorio e fuori dal laboratorio. Per i consigli e gli insegnamenti offerti sempre con disponibilità e pazienza. Grazie!*

*Grazie alla **Eli Deve**, per la sua presenza, il suo sostegno e l'ascolto nelle nostre lunghe passeggiate dopo il lavoro.*

*Un grazie anche alla **Dani Depo**, per i suoi consigli in laboratorio e per le cavolate sparate insieme nel tempo in cui si è condiviso il lavoro quotidiano sugli stessi banconi e che anche ora non mancano!*

*Grazie alla **Rosa Balooooos** per i momenti passati insieme e le serate milanesi!*

*Un grazie anche a **Kumar**, il mio collega-dottorando-insegnante di inglese!*

*Per non dimenticare nessuno, ringrazio tutti i colleghi del grande **ex lotto Q**, per aver reso le giornate di lavoro sempre e comunque più colorite e piacevoli.*

Un ringraziamento speciale a tutta la mia famiglia, in modo particolare ai miei genitori che mi hanno permesso di raggiungere questo importante obiettivo della mia vita, sostenendomi nelle difficoltà e incoraggiandomi a dare sempre il meglio, per tutti i sacrifici che hanno affrontato e per il sostegno che mai mi hanno fatto mancare. Dedico a voi questo traguardo.

“...ma dalle grandi alle piccole cose, tutto avrà un senso perché esiste lui. Potrò guardare dentro al suo cuore ed avvicinarmi al suo mistero non come quando io ragiono, ma come quando respiro...”

*Grazie a **Pietro**, perché hai scelto di camminare al mio fianco.*

“Le feste passano, gli amici no, comunque vada, sai che non ti scorderò, possiamo crederci, amico mio, proviamo a farcela una volta in più...”

*Un ringraziamento super a **tutti i miei amici!!!** Elencarvi tutti significherebbe scrivere un'altra tesi...quindi sappiate che siete tutti inclusi in questo enorme grazie!!!*

*Il Gruppo Teatrale **Kairòs** con cui condivido serate infinite di prove, rubate alla stesura della tesi...Ma che non rimpiango! Con l'augurio di continuare a divertirvi insieme coltivando questa nostra passione! Grazie!*

*Il gruppone **Preado**, con Suor Ale e Ale, grazie ragazzi! Camminare con voi è sempre più un'avventura di vita!*

Tutti le persone che qui non riesco a nominare ma che sono sempre con me, le persone che fanno parte della mia vita e le persone che ne hanno fatto parte e ora sono tra le stelle. Grazie!!!

Grazie a voi tutti per avermi aiutato a diventare la persona che sono oggi.

La vostra presenza è per me un Suo dono inestimabile!

E infine dedico questa tesi...a me stessa! Raggiunto questo importante traguardo voglio partire da qui per un nuovo cammino: sia esso splendido e sereno, sia esso in salita, tortuoso e difficile, vale sempre e comunque la pena di intraprendere la strada, con la fiduciosa certezza che tutti voi continuerete a starmi accanto e a camminare con me nel lungo sentiero della vita.

*“Qualunque cosa tu possa fare o sognare, inizia ora.
L’audacia ha in sé genio, potere e magia. Inizia ora!”.*

*“I may never find all the answers
I may never understand why
I may never prove
What I know to be true
But I know that I still have to try”*